

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI ROMA**

**“LA SAPIENZA”**



**SAPIENZA**  
UNIVERSITÀ DI ROMA

**XXXI Ciclo del Dottorato di Ricerca in  
Fisiopatologia ed Imaging Cardio-Toraco-Vascolare**

**Coordinatore Prof. F. Venuta**

**TESI DI DOTTORATO**

***Relazione tra ipovitaminosi D e disfunzione diastolica  
pre-clinica in pazienti affetti da  
lupus eritematoso sistemico***

**Tutor**

Chiar.<sup>mo</sup> Prof. Luciano Agati

**Dottorando**

Dott. Daniele Berardi

**ANNO ACCADEMICO**

**2017-2018**

## ***Indice***

<b>Introduzione</b>	<b>4</b>
<b>1. Vitamina D : caratteristiche molecolari, meccanismo biologico d'azione e implicazioni cliniche.</b>	
1.1 Sintesi e metabolismo della vitamina D	6
1.2 Meccanismo d'azione	7
1.3 Clinica della ipovitaminosi D	9
<b>2. La carenza di vitamina D nelle malattie cardiovascolari</b>	
2.1 Meccanismi biologici e fisiopatologici della ipovitaminosi D nel danno cardiovascolare	12
2.2 Correlazione clinica tra ipovitaminosi D e fattori di rischio cardiovascolari	15
2.3 Correlazione clinica tra ipovitaminosi D e cardiopatia ischemica	17
2.4 Correlazione clinica tra ipovitaminosi D e insufficienza cardiaca	20

<b>3. Il lupus eritematoso sistemico : un modello fisiopatologico e clinico della carenza vitaminica D</b>	
3.1 Storia ed epidemiologia	22
3.2 Eziopatogenesi	23
3.3 Criteri classificativi e diagnosi	26
3.4 Manifestazioni cliniche e storia naturale	27
3.5 Terapia	31
 <b>4 . Danno cardiovascolare nel LES : stato dell'arte</b>	
4.1 Epidemiologia e patogenesi	33
4.2 Pericardite	34
4.3 Aterosclerosi accelerata	35
4.4 Endocardite di Libman-Sacks	37
 <b>5. Parte sperimentale</b>	
5.1 Scopo dello studio	40
5.2 Materiali e metodi	40
5.3 Valutazione sierologica	41
5.4 Valutazione ecocardiografica	42
5.5 Raccolta dati	45
5.6 Analisi statistica	46
5.7 Risultati	46
 <b>6. Conclusioni</b>	49
 <b>7. Indice delle figure</b>	51
 <b>8. Bibliografia</b>	60

## *Introduzione*

La vitamina D è un ormone steroideo noto per i suoi effetti sul metabolismo osseo e pertanto da tempo impiegata nella prevenzione e nel trattamento dei difetti di mineralizzazione ossea. Il crescente diffuso spostamento degli esseri umani dall' ambiente naturale verso gli spazi chiusi, unitamente con le raccomandazioni di evitare un'esposizione diretta al sole per il rischio di cancro cutaneo, ha indotto una globale carenza di vitamina D<sup>1</sup>. Inoltre, alcune condizioni morbose si associano ad una elevata prevalenza di deficit di vitamina D: tra queste, il lupus eritematoso sistemico espone ad un rischio aumentato di ipovitaminosi D per molteplici motivi, che saranno più avanti esplicitati<sup>2</sup>. Tradizionalmente la vitamina D è stata associata prioritariamente alla salute ossea. Tuttavia è divenuto evidente che uno stato adeguato di vitamina D è importante per la funzione ottimale di molti organi e tessuti corporei, compreso il sistema cardiovascolare. Nuove prospettive si sono infatti aperte con la dimostrazione che i recettori per la vitamina D sono espressi, oltre che su diverse cellule del sistema immunitario, anche a livello dell'apparato cardiocircolatorio<sup>3</sup>. L'ipovitaminosi D è infatti essere risultata frequentemente associata ad ipertensione, patologia aterosclerotica, diabete e sindrome metabolica, ipertrofia ventricolare sinistra, scompenso cardiaco, infiammazione vascolare cronica<sup>4</sup>.

Inoltre, è ben nota la presenza di un importante deficit di vitamina D in pazienti affetti da insufficienza renale cronica; in condizioni fisiologiche, infatti, il rene, è la sede di attivazione della vitamina D (colecalfiferolo) introdotta con la dieta e, in pazienti con insufficienza renale cronica, l'ipovitaminosi D correla strettamente con la disfunzione vascolare endoteliale<sup>5</sup>.

A tutt'oggi non esistono studi che valutino l'impatto della ipovitaminosi D sulla funzione diastolica in pazienti che siano scevri da patologie cardiovascolari capaci, anch'esse, di giustificare una anomalia del rilasciamento e delle pressioni di riempimento cardiache. Parallelamente, fino

ad oggi non sono mai stati condotti studi clinici di intervento che abbiano verificato gli effetti della somministrazione della vitamina D sulla funzione ventricolare sinistra in pazienti cardiopatici; le evidenze di efficacia di tale approccio terapeutico sono limitate a casi aneddotici riportati in letteratura. Da questa carenza di dati in letteratura, e dalla profonda diffusione della ipovitaminosi D sia nella popolazione generale che in campioni di pazienti selezionati per patologia, è nata l'intenzione di studiare una eventuale correlazione diretta tra carenza ormonale e alterazioni precliniche della diastole.

# ***1. Vitamina D : caratteristiche molecolari, meccanismo biologico d'azione e implicazioni cliniche.***

## **1.1 Sintesi e metabolismo della vitamina D**

In natura esistono varie forme di vitamina D, ma quelle di maggiore rilevanza biologica e clinica sono due: la vitamina D2 (ergocalciferolo) e la vitamina D3 (colecalfiferolo). La vitamina D2 è di origine vegetale ed è il prodotto dell'irradiazione ultravioletta B (UVB) dell'ergosterolo. La vitamina D3, invece, viene sintetizzata dalla cute (80% del fabbisogno) per irradiazione UVB del 7-deidrocolesterolo. Entrambe le forme di vitamina D vengono assunte con la dieta (la vitamina D2 si trova essenzialmente nei vegetali e la vitamina D3 in molteplici alimenti, tra cui pesce, uova, funghi, carne, burro e latte), ma gli alimenti forniscono poche unità vitaminiche se paragonate alla quantità prodotta dalla cute in risposta alla luce solare. La vitamina D non è in grado di funzionare senza essere idrossilata: viene metabolizzata nel fegato in 25-idrossivitamina D [25(OH)D], forma inattiva dell'ormone. La 25-idrossivitamina D viene infine trasformata nella forma attiva, la 1,25-diidrossivitamina D [1,25(OH)2D], grazie all'azione dell'enzima 1 $\alpha$ -idrossilasi, espresso dalle cellule del tubulo prossimale del rene. La produzione renale di vitamina D è strettamente regolata dai livelli plasmatici di paratormone (PTH), calcio e fosforo. Il catabolismo di 25(OH)D e 1,25(OH)2D in acido calcitroico, biologicamente inattivo, è effettuato dall'enzima 24 $\alpha$ -idrossilasi, espresso quasi ubiquitariamente (figura 1). La stessa 1,25(OH)2D è un potente induttore della 24 $\alpha$ -idrossilasi<sup>6</sup>.

La vitamina D può essere considerata un ormone perché, seppur sintetizzata prevalentemente in un organo (il rene), viene poi dismessa nel circolo sistemico, potendo quindi interagire virtualmente con ogni tessuto. Oltre alle cellule del tubulo prossimale del rene, tuttavia, altri tipi di cellule possiedono il

corredo enzimatico necessario per produrre l'ormone attivo *in loco*: la vitamina D extrarenale sembra agire in primo luogo come fattore autocrino/paracrino con specifiche funzioni cellulari, come l'inibizione della proliferazione, la promozione della differenziazione cellulare e la regolazione della risposta immune. La principale via di inattivazione dei metaboliti della vitamina D è una idrossilazione aggiuntiva da parte della vitamina D-24-idrossilasi, un enzima espresso nella maggior parte dei tessuti. Lo stesso 1,25(OH)<sub>2</sub>D è il maggior induttore di tale enzima, e promuove così la propria eliminazione autolimitando i propri effetti biologici. I metaboliti polari dell'1,25(OH)<sub>2</sub>D vengono secreti nella bile e riassorbiti attraverso il circolo entero-epatico; alterazioni di tale circolazione, quali si osservano nelle malattie dell'ileo terminale, portano ad una perdita accelerata della vitamina D.

## 1.2 Meccanismo d'azione

La 1,25(OH)<sub>2</sub>D esplica la maggior parte delle sue azioni biologiche legandosi ad un recettore tissutale, il recettore della vitamina D (VDR), che appartiene alla superfamiglia dei recettori nucleari e alla sottofamiglia che include i recettori tiroidei, i recettori dei retinoidi e i recettori attivati dai proliferatori dei perossisomi. Il VDR si lega a specifiche sequenze del DNA formando un eterodimero con il recettore X dei retinoidi e reclutando una serie di coattivatori; il risultato è l'induzione dell'espressione dei geni bersaglio. Oltre a questo meccanismo d'azione definito "genomico", il calcitriolo può agire secondo un pathway "non genomico", e questo ha portato ad ipotizzare l'esistenza di un recettore VDR di membrana plasmatica che sarebbe capace di interagire con ligandi diversi da quelli del recettore nucleare. La presenza di VDR in tessuti che non partecipano all'omeostasi del tessuto osseo ha portato alla scoperta di molteplici funzioni controllate dalla vitamina D<sup>7</sup> (figura 2).

*Effetti classici della vitamina D:* l'effetto più noto è sicuramente l'azione ormonale sul metabolismo calcio-fosforico; la vitamina D aumenta la concentrazione sierica di calcio e fosfato attraverso vari meccanismi:

- 1) induce la sintesi a livello intestinale delle proteine coinvolte nell'assorbimento di questi due elettroliti;

- 2) stimola il *Rank-ligand* negli osteoblasti attivando l'osteoclastogenesi e accelerando il riassorbimento osseo;
- 3) interviene a livello dei tubuli distali renali, aumentando il riassorbimento di calcio e fosfato.
- 4) *a livello delle paratiroidi* regola la produzione e la secrezione di PTH con cui agisce sinergicamente solo nei confronti del calcio; per quanto riguarda la fosfatemia, invece, i due ormoni hanno azione opposta. La carenza cronica di vitamina D causa iperparatiroidismo secondario che, a sua volta, può mediare molti degli effetti negativi cardiovascolari riconducibili al deficit di vitamina D. La soglia che induce aumento di paratormone è un livello di  $25(\text{OH})\text{D} < 30 \text{ ng/ml}$ . Ulteriori decrementi di concentrazioni sieriche di  $25(\text{OH})\text{D}$  inducono un proporzionale aumento di paratormone per il mantenimento di adeguati livelli di calcio ematico e corporeo. Il deficit di vitamina D può ridurre l'assorbimento di calcio intestinale in misura superiore al 50%. La conseguente diminuzione della calcemia induce rilascio di paratormone che corregge rapidamente i livelli di calcemia attraverso la mobilitazione di calcio dall'osso, l'aumentato riassorbimento di calcio dai tubuli renali e inducendo un'aumentata sintesi renale di  $1,25(\text{OH})_2\text{D}^8$ .

*Effetti non classici della vitamina D:* i recettori della vitamina D sono presenti in vari tipi cellulari ed è stata documentata l'espressione della  $1\alpha$ -idrossilasi nei macrofagi attivati, negli osteoblasti, nei cheratinociti, nelle cellule muscolari lisce dei vasi e a livello di prostata, colon e mammella. Ciò suggerisce un possibile ruolo della vitamina D nella prevenzione di malattie croniche, quali tumori, malattie autoimmunitarie, infezioni e patologie cardiovascolari. In particolare, la scoperta di recettori della vitamina D sulle cellule del sistema immunitario (cellule presentanti l'antigene, cellule natural killer, linfociti T e B) ha suggerito un ruolo immunomodulante per l'ormone. La vitamina D infatti svolge effetti regolatori diretti sulle funzioni del sistema immunitario: potenzia la risposta immune innata e sopprime quella adattativa. Inoltre le stesse cellule del sistema immunitario producono l'ormone, che agisce quindi attraverso una regolazione autocrina e paracrina delle funzioni immunitarie (Figura 1).

Nello specifico, sul piano cellulare, la risposta immunitaria innata implica l'attivazione dei *Toll-Like Receptors* (TLR), recettori transmembrana presenti



nei polimorfonucleati, nei monocito-macrofagi e nelle cellule epiteliali, deputati al riconoscimento dei patogeni. La 1,25 (OH)<sub>2</sub>D rappresenta il legame chiave tra l'attivazione dei TLR e la risposta antibatterica innata, stimolando la trascrizione di geni che codificano per peptidi antimicrobici, tra cui la catelicidina. (53. Di Il ruolo..). Altri studi hanno dimostrato che la vitamina D consente ai cheratinociti di evitare la sovra infezione batterica durante i processi di riparazione delle soluzioni di continuo della cute (32. Di Il ruolo...). Inoltre, la produzione autocrina di 1,25 (OH)<sub>2</sub>D da parte delle cellule dendritiche è in grado di programmare l' *homing* delle cellule T associate alla cute, che includono T-reg capaci di contrastare gli effetti pro-infiammatori indotti nel tessuto stesso<sup>9</sup> (figura 3).

### 1.3 Clinica della ipovitaminosi D

La sindrome clinica da carenza di vitamina D può essere la conseguenza di una insufficiente produzione cutanea, di un inadeguato apporto alimentare, di una perdita accelerata (per aumentato metabolismo correlato all'assunzione di barbiturici, fenitoina, rifampicina o una alterata circolazione entero-epatica), di un'alterata attivazione (ridotta idrossilazione in posizione 25 ad esempio per effetto dell'isoniazide o in posizione 1alfa per iperparatiroidismo, insufficienza renale, uso di chetoconazolo) o della resistenza ai suoi effetti biologici (per mutazioni del VDR o uso di fenitoina). La popolazione di pazienti più a rischio di sviluppare tale stato carenziale è rappresentata sicuramente dagli anziani, in quanto sia l'efficienza della sintesi di vitamina D nella cute sia il suo assorbimento intestinale diminuiscono con l'età. Indipendentemente dalla causa, le manifestazioni cliniche della carenza vitaminica derivano principalmente dal ridotto assorbimento intestinale di calcio, tenendo conto che una carenza di vitamina D lieve-moderata può essere asintomatica, mentre una carenza di lunga durata determina ipocalcemia con iperparatiroidismo secondario, ridotta mineralizzazione a livello scheletrico (riscontro radiografico di osteopenia e riscontro densitometrico di ridotta densità minerale ossea) e miopatia prossimale. In assenza di malattie intercorrenti l'ipocalcemia correlata

a ipovitaminosi D cronica raramente si manifesta con sintomi acuti quali parestesie o convulsioni; tuttavia il concomitante sviluppo di ipomagnesiemia, che riduce la funzione paratiroidea, o la somministrazione di potenti bifosfonati, che riducono il riassorbimento osseo, può portare a ipocalcemia acuta sintomatica. Clinicamente, nel bambino, prima della fusione delle epifisi, la carenza di vitamina D può causare rachitismo e ritardo di crescita, mentre nella vita adulta può tipicamente esacerbare o precipitare una situazione di osteopenia o di osteoporosi, causare osteomalacia e debolezza muscolare, aumentando il rischio di fratture. L'ipocalcemia e l'ipofosforemia che si associano alla carenza di vitamina D determinano una ridotta mineralizzazione della matrice ossea nota come osteomalacia con fratture e incurvamento delle ossa sottoposte al carico ponderale<sup>10</sup>.

La diagnosi di carenza di vitamina D si esegue mediante dosaggio del 25 (OH)D, poiché è la forma circolante prevalente di vitamina D ed ha un'emivita di circa 2-3 settimane; la 1,25 (OH)<sub>2</sub>D è la forma biologicamente attiva, ma la sua emivita in circolo è di sole 4-6 ore, i suoi livelli circolanti sono mille volte inferiori a quelli della 25 (OH)D ed in caso di carenza di vitamina sono normalizzati dall'azione del PTH. Non vi è un consenso assoluto sull'intervallo di normalità per la 25 (OH)D, tuttavia viene accettato come valore normale una concentrazione plasmatica > 30 ng/ml; il deficit di vitamina D viene generalmente classificato di grado lieve (tra 21-29 ng/ml), moderato (tra 10-20 ng/ml) e grave (<10 ng/ml)<sup>11</sup>.

<b>Livelli sierici di 25(OH)D (ng/ml)</b>	<b>Definizione clinica</b>
<10	Carenza grave
10-20	Carenza moderata
21-29	Carenza lieve
>29	Stato normo-vitaminico
>150	Stato tossico

La terapia della carenza vitaminica consiste in una supplementazione vitaminica con una dose giornaliera di almeno 800 UI alla luce del fatto che tale dosaggio associato ad una supplementazione di calcio riduce il rischio di fratture femorali. La vitamina D può essere somministrata con margini di sicurezza molto ampi e la tossicità si osserva in genere solo in pazienti che assumono dosi superiori a 40000 UI al giorno. Insieme alla vitamina D deve essere sempre somministrata una adeguata supplementazione di calcio (pari a 1,5-2 g di calcio elementare die), dal momento che quasi tutte le conseguenze della carenza vitaminica derivano da una alterata omeostasi minerale<sup>12</sup>. In pazienti con ridotta idrossilazione in 1 alfa è preferibile usare analoghi della vitamina D che non richiedono questo passaggio di attivazione come il calcitriolo al dosaggio di 0,25-0,5 mcg/die. In presenza di malassorbimento intestinale possono essere necessarie dosi vitaminiche fino a 10 volte superiori ; in questi casi la terapia può essere effettuata mediante somministrazione intramuscolare fino a normalizzazione dei valori plasmatici.

## ***2. La carenza di vitamina D nelle malattie cardiovascolari***

### **2.1 Meccanismi biologici e fisiopatologici della ipovitaminosi D nel danno cardiovascolare**

La patologia cardiovascolare (CVD) è la principale causa di morbidità e mortalità nel mondo. Sebbene il ruolo dei fattori di rischio tradizionali sia ben consolidato, è noto che essi non possono spiegare completamente lo sviluppo di CVD; è evidente, infatti, che esiste una varietà di fattori molecolari e poi clinici in grado di modulare e favorire l'insorgenza di danno cardiovascolare, e tra questi figura sicuramente la vitamina D<sup>13</sup>.

Numerosi studi hanno documentato un effetto regolatorio del colecalciferolo nel sistema cardiovascolare; tale modulazione avviene a vari livelli fisiopatologici:

- 1) sistema renina-angiotensina-aldosterone : è stato dimostrato che topi knock-out per il gene che codifica per il recettore per vitamina D (VDR) hanno una maggiore espressione di renina e, conseguentemente, una aumentata sintesi di angiotensina II e pertanto sviluppano ipertensione con ipertrofia miocardica. Analogamente, nell'uomo la misurazione delle concentrazioni plasmatiche del 25(OH)D ha rivelato che concentrazioni inferiori di vitamina D si accompagnano a livelli superiori di angiotensina circolante e, in pazienti ipertesi, l'attività reninica è inversamente correlata con la concentrazione di 1,25(OH)<sub>2</sub>D ; pertanto, la supplementazione regolare con vitamina D aiuterebbe nel ridurre la concentrazione plasmatica e l'attività della renina e dell'angiotensina stessa<sup>14</sup>.
- 2) cellule muscolari lisce : le cellule muscolari lisce vascolari esprimono il recettore per vitamina (VDR), ed è stato ipotizzato che il calcitriolo influenzi la proliferazione, contrazione e migrazione di tali elementi cellulari, così come la formazione di calcificazioni vascolari. Inoltre, l'aumentata produzione di prostaciclina, che appare essere influenzata dai livelli plasmatici di 1,25(OH)<sub>2</sub>D, sembrano suggerire che il calcitriolo sia in grado di indurre

vasodilatazione e di esercitare un effetto anti-aterosclerotico. Inoltre, sempre il calcitriolo potrebbe prevenire lo sviluppo di placche aterosclerotiche inibendo la conversione dei macrofagi in “foam cells”. Esiste, poi, evidenza di una influenza della vitamina D sulla disfunzione endoteliale nitrossido-mediata : il calcitriolo aumenta l'attività della nitrossido-sintetasi endoteliale e protegge la cellula endoteliale dagli effetti del danno da glicazione. A favore del ruolo della vitamina D nel rimodellamento vasale, alcuni esperimenti animali hanno dimostrato che il calcitriolo inibisce l'azione delle metallo proteinasi, enzimi coinvolti nel rimodellamento della parete vasale capaci di favorire l'instabilità della placca aterosclerotica<sup>15</sup>.

- 3) cardiomiociti : i cardiomiociti isolati da topi knock-out per il gene VDR esibiscono anomalie della contrazione e del rilasciamento; la vitamina D, infatti, tramite il suo recettore nucleare, è in grado di modulare questi processi modificando la distribuzione delle catene miosiniche e regolando l'ingresso di ioni calcio nella cellula muscolare cardiaca. Inoltre, essa può esercitare una influenza anche sulla differenziazione fenotipica del cardiomiocita e sulla deposizione di collagene<sup>16</sup>. In uno studio coinvolgente pazienti sottoposti ad angiografia coronarica è stato dimostrato esistere una correlazione negativa tra concentrazione sierica di 25(OH)D e 1,25(OH)<sub>2</sub>D e grado di disfunzione ventricolare sinistra<sup>17</sup>. E' inoltre emerso che pazienti con concentrazioni plasmatiche di calcidiolo (uno dei metaboliti della vitamina D) inferiori a 10 ng/ml esibiscono un rischio più alto di morte per insufficienza cardiaca e morte cardiaca improvvisa se confrontati con soggetti con concentrazioni plasmatiche superiori a 30 ng/ml<sup>18</sup>.
- 4) processi infiammatori : l'aterosclerosi è ormai riconosciuta da tempo come una patologia a carattere infiammatorio, e pazienti affetti da insufficienza cardiaca cronica presentano livelli ematici più alti di citochine pro infiammatorie, come il tumor necrosis factor (TNF-alfa) e le interleuchine 1 e 6 (IL-1, IL-6). Trattando tale popolazione di pazienti con somministrazione di vitamina D al dosaggio di 4000 UI die per nove mesi si è osservata una riduzione del 10% delle concentrazioni plasmatiche del TNF-alfa e un aumento del 50% della concentrazione plasmatica della interleuchina 10 (IL-10), che è una potente citochina anti-infiammatoria<sup>19</sup>.

- 5) influenza sul sistema nervoso autonomo : diversi studi hanno dimostrato che il calcitriolo è coinvolto nella regolazione della produzione di catecolamine nelle cellule della midollare del surrene, potendo pertanto influenzare l'eccesso di tono adrenergico che caratterizza varie patologie cardiovascolari, prima fra tutte l'insufficienza cardiaca<sup>20</sup>.

Volendo approfondire più nello specifico l'azione della vitamina D sulla cellula muscolare cardiaca, è possibile evincere da diversi studi che la vitamina D esercita due principali azioni sul cardiomiocita<sup>21</sup>: 1) stimolare la produzione di proteine contrattili, 2) attivare funzioni intracellulari a livello del reticolo sarcoplasmatico e dei mitocondri concernenti rispettivamente il metabolismo del calcio e la produzione di energia cellulare. Queste funzioni fisiologiche sono state valutate studiando in particolare la frequenza di *turnover* delle proteine muscolari sia *in vitro* che *in vivo*: le numerose ricerche hanno concordemente dimostrato che la degradazione delle proteine miofibrillari è aumentata quando è presente una carenza di vitamina D. Sono stati identificati diversi meccanismi patologici attraverso i quali si sviluppa la disfunzione della contrazione muscolare. La carenza di vitamina D, infatti, è associata sia ad una riduzione del contenuto muscolare actomiosinico che ad una riduzione della generazione della forza muscolare, ad alterazioni del trasporto del calcio intracellulare da parte del reticolo sarcoplasmatico, ad una riduzione delle concentrazioni del calcio mitocondriale e, probabilmente, ad un'alterata capacità di gestire le riserve di ATP da parte dei mitocondri. Inoltre, sempre a livello dei cardiomiociti è stato dimostrato che la vitamina D ha uno specifico effetto modulatore dell'attività immunitaria, regola il metabolismo intracellulare del ferro, ha un effetto modulatore sui processi cellulari durante stress ossidativo e/o ischemia, controlla la sintesi del tessuto collagene, il sistema renina-angiotensina e le metalloproteasi controregolando i principali meccanismi fisiopatologici attraverso i quali si sviluppa l'ipertrofia miocardica<sup>22,23</sup>. Queste funzioni a livello cardiaco sono mediate sia dal meccanismo d'azione genomico che non genomico. La vitamina D infatti interagisce con entrambi i suoi recettori, il primo localizzato nel nucleo cellulare e capace di stimolare direttamente la trascrizione di geni e la sintesi proteica (meccanismo genomico), il secondo appartenente alla famiglia dei

recettori per gli steroidi, situato a livello dei tubuli T, che esercita le sue azioni attraverso le vie metaboliche intracellulari innescate dalla proteinchinasi C, l'inositolo trifosfato e l'acido arachidonico (meccanismo non genomico)<sup>24</sup>. È stato inoltre documentato che è proprio il deficit di vitamina D in sé e non la risposta patologica all'ipocalcemia che inevitabilmente si accompagna a tale deplezione vitaminica ad alterare le funzioni delle cellule miocardiche sopra descritte, poiché evidenze sperimentali hanno chiaramente dimostrato che la normalizzazione della calcemia non produce miglioramenti della funzione delle cellule miocardiche in presenza di un persistente stato di ipovitaminosi D (figura 4).

## **2.2 Correlazione clinica tra ipovitaminosi D e fattori di rischio cardiovascolari**

I diversi meccanismi biologico-molecolari e fisiopatologici precedentemente esposti possono giustificare l'associazione tra deficit di vitamina D e patologie cardiovascolari. Ad esempio, è noto che una deficienza/insufficienza di vitamina D è associata con obesità, intolleranza glucidica, sindrome metabolica, fumo, ipertensione arteriosa e dislipidemia<sup>25</sup>. In un'indagine rappresentativa della popolazione statunitense (NHANES III), le prevalenze di ipertensione, diabete, obesità ed ipertrigliceridemia sono risultate tutte significativamente più elevate nei quartili più bassi rispetto a quelli più alti di 25(OH)D sierica<sup>26</sup>.

Relativamente alla patologia diabetica, in molti studi è stata dimostrata un'associazione diretta tra insulino-resistenza e bassi valori sierici di 25(OH)D, ed un'associazione inversa con l'assunzione di vitamina D<sup>27</sup>. Una recente meta-analisi di studi osservazionali<sup>28</sup> ha rilevato un'evidente associazione inversa tra valori sierici di 25(OH)D e prevalenza di diabete mellito di tipo 2. Tuttavia, sebbene promettenti, i risultati degli studi riguardanti la supplementazione di vitamina D nell'ambito della prevenzione del diabete sono limitati dalla ridotta durata dei trial, dal basso numero di individui studiati, dalle diverse formulazioni farmaceutiche dei supplementi di vitamina D.

Analizzando il legame tra ipovitaminosi D e ipertensione arteriosa, l'analisi dei dati provenienti dal NHANES-III mostrano che bassi livelli di 25(OH)D sono associati con valori più alti di pressione arteriosa e, come già descritto, studi su animali hanno fornito evidenza che la vitamina D esercita un'azione regolatoria negativa sul sistema renina-angiotensina-aldosterone<sup>29,30</sup>. Queste osservazioni hanno condotto all'esecuzione di due trial randomizzati per studiare gli effetti della supplementazione con vitamina D sulla pressione arteriosa sistemica<sup>31,32</sup>. Entrambi gli studi hanno raggiunto una significativa riduzione della pressione sistolica sebbene le formulazioni e le dosi assunte differivano fortemente (800 U.I. di vitamina D3 nel primo studio, ed un'unica somministrazione di 100000 U.I. di vitamina D2 nel secondo. Inoltre, entrambi i trial sono stati condotti per sole 8 settimane, per cui non è chiaro quale avrebbe potuto essere l'effetto anti-ipertensivo della vitamina D nel lungo periodo.

Poiché i singoli componenti di intolleranza glucidica, ipertrigliceridemia, obesità ed ipertensione arteriosa sono associati con bassi livelli di 25(OH)D, non desta meraviglia che in molti studi il deficit di vitamina D sia anche risultato associato alla sindrome metabolica. Nello stesso NHANES III, la possibilità di avere una sindrome metabolica, dopo aggiustamenti statistici multipli, diminuiva progressivamente all'aumentare dei quintili di 25(OH)D sierica. Nelle donne arruolate dallo studio Women's Health Initiative (WHI), l'assunzione con la dieta di vitamina D è risultata inversamente associata con la prevalenza di sindrome metabolica<sup>33</sup>. Nello stesso studio, la supplementazione con calcio e vitamina D è risultata avere un effetto significativo nella prevenzione dell'aumento ponderale, confermando come l'obesità possa essere associata con alterazioni del sistema endocrino indotte da carenza di vitamina D.

Inoltre è interessante notare come una quota parte degli effetti negativi della vitamina D sul sistema cardiovascolare siano mediati non direttamente dalla ipovitaminosi, ma indirettamente tramite l'aumento delle concentrazioni plasmatiche del paratormone (PTH) che è in grado di favorire la fibrosi ventricolare sinistra e parietale vasale e l'apoptosi dei cardiomiociti<sup>34</sup>.



## 2.3 Correlazione clinica tra ipovitaminosi D e cardiopatia ischemica

La carenza di vitamina D può essere coinvolta nello sviluppo dell'aterosclerosi e della cardiopatia ischemica nell'uomo. Apparentemente, i fenomeni patologici dell'aterosclerosi e dell'osteoporosi sembrano essere due entità disgiunte dal punto di vista fisiopatologico. Tuttavia, il dato clinico che nelle donne il processo dell'aterosclerosi subisce un'accelerazione notevole in concomitanza con lo sviluppo dell'osteoporosi dopo la menopausa suggerisce che le due malattie possono avere radici comuni e sono in realtà dal punto di vista eziologico molto più vicine di quanto ritenuto in passato<sup>35</sup>. La stessa carenza di vitamina D che favorisce l'osteoporosi, infatti, è una delle cause principali del mancato controllo metabolico sulla produzione di citochine attive sul sistema dell'infiammazione (aumentati livelli di proteina C-reattiva ed interleuchina-6, ridotti livelli di interleuchina-10) attraverso il quale l'aterosclerosi prende corpo. Le placche ateromasiche sono la comune espressione fenotipica dell'aterosclerosi e, quando presenti a livello coronarico, sono associate ad eventi ischemici cardiaci acuti<sup>36</sup>. Importanti studi clinici hanno concordemente documentato una stretta correlazione inversa tra livelli ematici di vitamina D e calcificazioni aterosclerotiche dei vasi coronarici<sup>37,38</sup>, confermando l'ipotesi che i processi che generano e sviluppano queste ultime sono regolati da vie metaboliche comuni a quelle dell'osteogenesi scheletrica. L'ischemia miocardica, infine, può essere favorita dalla carenza di vitamina D attraverso l'attivazione del sistema renina-angiotensina-aldosterone con conseguente aumento della pressione arteriosa sistemica e incremento della ipertrofia e fibrosi miocardica. Inoltre, relativamente all'ambito terapeutico della cardiopatia ischemica, è stato ipotizzato che l'effetto delle statine (inibitori dell'enzima HMG-CoA reduttasi) possa essere mediato da un'aumentata azione della vitamina D verosimilmente indotta da una stimolazione dei VDR o da una ridotta inattivazione della vitamina D stessa; infatti, la terapia con statine può aumentare i livelli sierici di 25(OH)D<sup>39</sup>, nonostante essa inibisca la sintesi del colesterolo, che rappresenta un precursore della vitamina D. Tutto ciò può giustificare l'assenza di un effetto negativo (o

addirittura un effetto benefico, almeno nel breve periodo) dell'assunzione di statine sulle fratture ossee.

Alla luce dell'associazione tra stato deficitario di vitamina D e fattori di rischio, è intuibile che in soggetti con eventi vascolari sia riscontrabile una più alta prevalenza di deficienza di vitamina D. In uno studio prospettico di 1739 soggetti partecipanti al Framingham Offspring Study<sup>40</sup>, gli individui con bassi livelli di 25(OH)D (inferiori a 37,5 nmol/l) avevano il 62% di maggiore incidenza di malattie cardiovascolari, quali infarto del miocardio, insufficienza coronarica e scompenso cardiaco rispetto a coloro con livelli di 25(OH)D di almeno 37,5 nmol/l. Nel WHI, la supplementazione con 1000 mg di calcio insieme a 400 U.I. di vitamina D confrontata con placebo non è riuscita a ridurre l'incidenza di infarto miocardico, ischemia cerebrale, ospedalizzazioni per scompenso cardiaco e mortalità cardiovascolare<sup>41</sup>. Tuttavia, gravi limitazioni dello studio, quali i bassi livelli di vitamina D assunti, la potenziale azione negativa sugli eventi cardiovascolari della concomitante somministrazione di calcio, l'assenza di misurazione dei livelli sierici di 25(OH)D e/o di 1,25(OH)2D nel braccio randomizzato a vitamina D rendono estremamente difficoltosa l'interpretazione dei risultati. In uno studio caso-controllo tra i partecipanti maschi dello studio Health Professionals Followup<sup>42</sup>, gli uomini con bassi valori di 25(OH)D ( $\leq 37,5$  nmol/l) avevano un rischio relativo di infarto miocardico di 2,09 [95% intervallo di confidenza (IC) 1,24-3,54] rispetto a coloro con valori di 25(OH)D considerati sufficienti ( $\geq 75$  nmol/l), dopo aggiustamenti per diversi fattori, anche correlati con lo stile di vita. Sono stati inoltre pubblicati i dati sull'associazione tra vitamina D e mortalità totale e cardiovascolare provenienti da uno studio prospettico di coorte relativo a 3258 soggetti consecutivi in attesa di eseguire un esame coronarografico<sup>43</sup>. Durante un follow-up medio di 7,7 anni, 737 pazienti (22,6%) sono morti; tra essi si sono registrate 463 morti cardiovascolari. Il rischio [hazard ratio (HR)] aggiustato per vari parametri, relativo ai pazienti nei due quartili più bassi di 25(OH)D (19,3 e 33,3 nmol/l di media) rispetto ai pazienti nel quartile più alto (71 nmol/l), era più alto sia riguardo alla mortalità totale (HR 2,08; 95% IC 1,60- 2,70, e HR 1,53; 95% IC 1,17-2,01, rispettivamente) sia alla mortalità cardiovascolare (HR 2,22; 95% IC 1,57-3,13,

e HR 1,82; 95% IC 1,29-2,58, rispettivamente). In un altro recente studio prospettico di 3408 soggetti di età superiore a 65 anni nell'ambito del NHANES III, durante un follow-up medio di 7,3 anni è stata dimostrata una significativa associazione inversa tra livelli basali di 25(OH)D e rischio di mortalità totale, soprattutto cardiovascolare<sup>44</sup>. L'associazione è risultata evidente [rischio di mortalità raddoppiato con livelli di 25(OH)D <25 nmol/l] e lineare con i valori di vitamina D e indipendente da fattori demografici ed altri fattori di rischio cardiovascolare. Di rilievo, in questo studio, è che la presenza di iperlipidemia, in particolare una colesterolemia non HDL  $\geq 160$  mg/dl, era correlata in modo significativamente inverso alla mortalità totale (15% di riduzione di rischio relativo di morte), e non correlata alla mortalità cardiovascolare. D'altronde, una tendenza verso una più bassa mortalità era stata già osservata nel British Vitamin D Intervention Trial<sup>44</sup>, nel quale un gruppo di soggetti aveva ricevuto una capsula contenente 100000 U.I. di vitamina D3 ogni 4 mesi per 5 anni (corrispondenti a circa 840 U.I. di vitamina D al giorno). In un'analisi di sottogruppi, le concentrazioni sieriche di 25(OH)D erano più alte di 21 nmol/l nel gruppo che assumeva vitamina D rispetto al gruppo placebo. I rischi relativi di incidenza di patologie cardiovascolari, cancro, e cancro del colon-retto sono risultati rispettivamente 0,90 (0,77-1,06), 1,11 (0,86-1,42) e 1,02 (0,60-1,74). Tuttavia, per la mortalità per singole cause, questi rapporti erano rispettivamente 0,84 (0,65-1,20), 0,86 (0,61-1,20) e 0,62 (0,24-1,60). Da questi dati si evince che, sebbene non significativo, il rischio di incidenza di malattie è risultato essere vicino a 1, mentre il rischio di mortalità è risultato sempre inferiore, suggerendo che l'effetto protettivo della vitamina D a queste dosi è efficace più sul rischio di mortalità cardiovascolare e per cancro che sulla incidenza di malattie. A conferma di ciò, una metanalisi di trial clinici è giunta alla conclusione che la supplementazione con vitamina D riduce del 7% la mortalità in soggetti adulti e anziani durante un'osservazione media di 5,7 anni<sup>45</sup>. Negli studi considerati in questa meta-analisi, la dose giornaliera di vitamina D assunta variava da 300 a 2000 U.I., con una media di 528 U.I.; nei pazienti che avevano assunto vitamina D, le concentrazioni sieriche di 25(OH)D erano aumentate di 40 nmol/l, mentre nel gruppo controllo erano diminuite di 6,5 nmol/l. Sebbene gli

autori non siano riusciti a valutare le cause specifiche di mortalità, l'effetto relativamente immediato e di grandezza sufficiente ad influenzare la mortalità totale suggerirebbe un rilevante effetto protettivo della vitamina D sulla mortalità cardiovascolare.

## **2.4 Correlazione clinica tra ipovitaminosi D e insufficienza cardiaca**

I citati dati sperimentali sull'azione regolatoria della vitamina D sul sistema renina- angiotensina-aldosterone, associati alla sua azione immunomodulatoria indicano, come suggerito anche da diverse evidenze cliniche, che adeguati livelli di vitamina D possono contribuire anche alla prevenzione della insufficienza cardiaca. Recentemente, in uno studio di 60 pazienti (43 uomini e 17 donne) con frazione di eiezione ventricolare sinistra  $\leq 40\%$ , la distanza percorsa durante il *six-minute walking test* è risultata direttamente correlata con i valori di  $25(\text{OH})\text{D}^{46}$ ; inoltre stili di vita normalmente associati con uno stato adeguato di vitamina D (essere soci di un gruppo sportivo, frequente esposizione estiva al sole, vita in campagna) erano meno presenti nell'anamnesi di soggetti con scompenso cardiaco rispetto ai controlli sani. Valori molto bassi di vitamina D sono riscontrati frequentemente in pazienti con scompenso cardiaco avanzato; tra essi, gli individui con valori più alti di  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  hanno mostrato avere un odds ratio di morte o trapianto cardiaco di 0,5 (95% IC 0,33- 0,76) rispetto ai soggetti nel terzile più basso, dopo aggiustamenti per diversi fattori potenzialmente confondenti<sup>47</sup>. Questi dati indicano che una insufficienza di vitamina D può ritenersi un fattore concausale di scompenso cardiaco, e non solo la conseguenza di alterazioni e malattie associate ad esso. Inoltre, bassi livelli di vitamina D possono rappresentare anche un fattore di rischio per i più severi eventi associati allo scompenso cardiaco, quali mortalità e necessità di trapianto di cuore. Mancano attualmente evidenze scientifiche sull'efficacia di un trattamento farmacologico con vitamina D nelle popolazioni di pazienti con scompenso cardiaco. Esiste, tuttavia, un forte razionale nel considerare tale approccio terapeutico in particolare nei soggetti più anziani,

con comorbidità ed in uno stadio più avanzato di malattia. Gli effetti della vitamina D sul metabolismo del muscolo cardiaco sono molteplici e fondamentali, una carenza di vitamina D può essere di per sé fattore aggravante di disfunzione miocardica e dovrebbe essere costantemente ricercata nella pratica clinica.

### ***3. Il lupus eritematoso sistemico : un modello fisiopatologico e clinico della carenza vitaminica D***

#### **3.1 Storia del lupus ed epidemiologia**

Il lupus eritematoso sistemico (LES) è il prototipo delle malattie infiammatorie sistemiche autoimmuni, in grado di colpire diversi organi ed apparati. L'estrema eterogeneità di questa patologia ha indotto molti autori a considerarla una vera e propria sindrome. Il termine latino "lupus" veniva utilizzato durante il Medioevo per indicare lesioni cutanee erosive che conferivano al volto delle persone affette l'aspetto di un lupo<sup>48</sup>. Nel 1846 il medico viennese Ferdinand von Hebra introdusse la metafora della farfalla per descrivere il rash malare caratteristico della malattia. Egli fu anche il primo ad utilizzare il termine "lupus erythematosus" e a pubblicare le prime illustrazioni nel suo "Atlas of skin disease"<sup>49</sup>. In realtà, il lupus fu riconosciuto per la prima volta come malattia sistemica con manifestazioni d'organo da Moriz Kaposi (1837-1902)<sup>50</sup>. La forma sistemica fu ulteriormente dimostrata da Osler a Baltimora e da Jadassohn a Vienna<sup>51,52</sup>. Altre importanti pietre miliari nella storia del lupus sono state la descrizione della falsa positività al test per la sifilide da parte di Reinhart e Hauck in Germania (1909); la descrizione dell'endocardite da parte di Libman e Sacks a New York (1923)<sup>53</sup>; la descrizione delle alterazioni renali glomerulari da parte di Baehr (1935) e l'uso dell'espressione "malattia diffusa del tessuto connettivo" da parte di Klemperer, Pollack e Baehr (1941)<sup>54</sup>. L'inizio dell'era moderna del LES fu segnato dalla scoperta della cellula "LE" ad opera di Hargraves, Richmond e Morton nel 1948<sup>55</sup>.

L'incidenza del lupus negli ultimi 40 anni si è quasi triplicata, probabilmente a causa dell'aumento delle diagnosi di malattia lieve. Il tasso di incidenza della malattia è di 2-8 casi su 100000 abitanti l'anno in Europa, Nord America e Sud America e la prevalenza stimata è di 27 casi su 100000 nei caucasici, fino a 206 su 100000 nelle donne afro-americane<sup>56</sup>. Le femmine sono colpite 9 volte più frequentemente dei maschi e i Latino-Americani e gli Afro-Americani sono colpiti più frequentemente dei Caucasici e presentano, inoltre, un decorso più sfavorevole della malattia<sup>57</sup>. Il lupus

esordisce tra i 16 e i 55 anni nel 65% dei casi, prima dei 16 anni nel 20% dei casi e dopo i 55 anni nel restante 15% dei casi<sup>58</sup>. I maschi affetti da lupus hanno generalmente minore fotosensibilità e maggiore incidenza di sierositi, età più avanzata alla diagnosi e maggiore mortalità ad un anno rispetto alle femmine; nel sesso maschile, quindi, la malattia è tendenzialmente più grave<sup>59</sup>.

### 3.2 Eziopatogenesi

L'eziologia del LES non è ancora completamente compresa, ma molteplici fattori sono chiamati in causa nello sviluppo della malattia: genetici, epigenetici, immunoregolatori, ormonali ed ambientali. Questi fattori determinano la perdita dell'auto-tolleranza immunitaria, che si manifesta con una risposta immune diretta contro antigeni endogeni o “self”.

#### *Fattori genetici ed epigenetici.*

L'importanza dei fattori genetici è dimostrata dall'elevata concordanza di malattia nei gemelli monozigoti (40%) rispetto ai gemelli dizigoti (2-5%) e dal rischio fino a 30 volte maggiore di sviluppare la malattia nei fratelli di pazienti affetti da LES rispetto agli individui che non hanno tale familiarità<sup>60</sup>. La predisposizione genetica al LES coinvolge più geni: studi di associazione genome-wide (GWAS) hanno identificato molti loci fortemente associati con la malattia, la maggior parte dei quali coinvolti nei sistemi biologici di risposta immunitaria. Nei pazienti con LES si riscontrano carenze in omozigosi dei fattori del complemento C1q, C2 e C4, che possono influenzare la clearance degli immunocomplessi e dei corpi apoptotici, e l'espressione degli allotipi HLA-DR2 e HLA-DR3 con frequenza maggiore rispetto alla popolazione normale. Varianti geniche predisponenti al LES possono alterare l'attivazione dei linfociti B e T, la morte cellulare programmata, la produzione di citochine (aumentata produzione di INF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-6 e IL-10 e ridotta produzione di IL-2 e TGF- $\beta$ ), la funzione delle cellule T-reg e TH17 e l'infiammazione legata all'attivazione delle cellule dendritiche<sup>61</sup>. Il rischio di sviluppare il LES è influenzato anche da effetti epigenetici, ossia modifiche dell'espressione genica causate da meccanismi diversi rispetto alle variazioni della sequenza di basi del DNA. Il fattore epigenetico meglio compreso è la

metilazione del DNA, che gioca un ruolo fondamentale in una varietà di processi biologici, come l'inattivazione del cromosoma X ed alcune neoplasie. Differenze nella metilazione dei geni possono spiegare, almeno in parte, la discordanza per il LES osservata in alcuni gemelli omozigoti<sup>62</sup>. I meccanismi epigenetici potrebbero inoltre rappresentare il collegamento eziopatogenetico attualmente mancante tra i fattori di rischio genetici ed ambientali.

#### *Fattori ambientali.*

I fattori ambientali sono chiamati in causa come “triggers”, cioè come fattori scatenanti la malattia in soggetti geneticamente predisposti. Questi includono la luce ultravioletta, il fumo di sigaretta, i farmaci e le infezioni virali. La luce ultravioletta stimola i cheratinociti a produrre non solo ribonucleoproteine (snRNP), che vengono espresse sulla superficie cellulare, ma anche citochine, che stimolano a loro volta la produzione di anticorpi<sup>63</sup>. È ben noto che alcuni farmaci inducano la formazione di autoanticorpi in un numero significativo di pazienti; è quanto avviene, ad esempio, nel caso dei farmaci metabolizzati per acetilazione, come la procainamide e l'idralazina: gli individui con fenotipo acetilatore lento sviluppano frequentemente la patologia, che prende il nome di “drug induced lupus”. Questi farmaci alterano inoltre l'espressione genica nei linfociti TCD4+ inibendo la metilazione e promuovendo l'autoreattività<sup>64</sup>. Numerosi studi hanno indagato il ruolo eziologico delle infezioni: i pazienti con LES hanno elevati titoli anticorpali contro il virus di Epstein-Barr (EBV) ed esibiscono un'aumentata viremia; l'EBV, inoltre, può infettare le cellule B ed interagire con esse promuovendo la produzione di mediatori infiammatori, tra cui l'INF- $\alpha$ <sup>65</sup>.

#### *Fattori ormonali.*

La maggiore prevalenza di malattia nel sesso femminile indica negli ormoni sessuali femminili un fattore di rischio per lo sviluppo del LES. In modelli murini, la somministrazione di estrogeni o di prolattina induce un fenotipo autoimmune con l'aumento di linfociti B autoreattivi<sup>66</sup>. Questa associazione estrogeni-autoimmunità è stata confermata dal Nurses' Health Study, da cui è emerso che le donne che facevano uso di contraccettivi orali avevano un rischio aumentato di sviluppare il LES rispetto alle donne che non li assumevano. Allo stesso modo, la terapia ormonale sostitutiva nelle donne in post-menopausa sembra incrementare il rischio di LES<sup>67</sup>.



*Patogenesi e meccanismi di danno tissutale.*

In un'elevata percentuale di pazienti (88%) almeno un autoanticorpo è presente già anni prima dell'esordio clinico della malattia (fino a 9.4 anni prima, con una media di 3.3 anni)<sup>68</sup>. Il LES risulta infatti dall'incontrollata produzione di autoanticorpi e dalla fissazione del complemento. Alla base della risposta autoimmunitaria c'è la perdita della tolleranza verso gli antigeni self. Lo stimolo alla produzione di questi autoanticorpi deriva dalla disregolazione dell'apoptosi, che risulta aumentata, e dalla inadeguata rimozione dei corpi apoptotici e dei residui nucleari, che determina un'esposizione prolungata del sistema immunitario ai componenti della membrana nucleare e cellulare<sup>69</sup>. Durante l'apoptosi, infatti, sulla superficie cellulare vengono espressi antigeni citoplasmatici e nucleari, normalmente intracellulari. Gli antigeni rilasciati dalle cellule apoptotiche vengono catturati dalle cellule dendritiche, che si comportano da APC (Antigen Presenting Cells), processando e presentando ai linfociti TCD4+ tali antigeni. I linfociti T CD4+, una volta attivati, stimolano a loro volta i linfociti B a produrre anticorpi specifici, attraverso la secrezione di citochine (come l'IL-21) e attraverso l'interazione tra le molecole di superficie CD40, espressa dai linfociti B, e CD40L (Ligand), presente sulla superficie dei linfociti T. Esiste un ulteriore meccanismo di attivazione dei linfociti B, indipendente dalla stimolazione da parte dei linfociti T, che consiste nell'attivazione diretta delle cellule da parte dell'antigene, attraverso il legame ad alcuni Toll Like Receptors (TLR4, TLR5, TLR9), tutti espressi sulla superficie dei linfociti B. Il legame degli autoanticorpi agli antigeni determina la formazione di immunocomplessi circolanti che, nell'individuo sano, sono rimossi grazie al legame con i recettori del frammento Fc (Frammento cristallizzabile) e con i recettori del complemento. Nei pazienti affetti da LES, al contrario, si riscontra un deficit dei meccanismi di rimozione degli immunocomplessi che, dunque, si depositano nei tessuti e causano un danno infiammatorio mediato dal reclutamento di cellule infiammatorie (macrofagi, linfociti, cellule dendritiche), dalla produzione di ROS (Specie Reattive dell'Ossigeno) e dalla sintesi di citochine infiammatorie (TNF $\alpha$ , INF $\alpha$ ) (22). L'INF $\alpha$ , in particolare, sembra svolgere un ruolo centrale nella patogenesi del danno immunomediato: viene prodotto principalmente dalle cellule dendritiche in seguito all'attivazione antigene-dipendente dei TLR ed ha potenti effetti biologici su molteplici tipi cellulari, tra cui le cellule dendritiche stesse, i linfociti B e T, i neuroni, le cellule del parenchima renale e quelle endoteliali. La

funzione di queste ultime, in particolare, viene danneggiata e si riduce la capacità dei precursori delle cellule endoteliali di riparare i danni all'endotelio<sup>70</sup>.

Nei pazienti con lupus sono stati descritti più di 100 autoanticorpi, che riconoscono come targets antigeni nucleari, antigeni citoplasmatici, antigeni della membrana cellulare, antigeni fosfolipidi-associati, cellule del sangue, cellule endoteliali, antigeni del sistema nervoso, proteine plasmatiche, proteine della matrice extracellulare e molti altri ancora. Dal punto di vista sierologico, alcuni autoanticorpi vengono riscontrati con maggior frequenza nei pazienti con LES e utilizzati, quindi, per porre diagnosi di malattia, in aggiunta ai criteri clinici e ad altri esami di laboratorio (figura 5).

### **3.3 Criteri classificativi e diagnosi**

I primi criteri classificativi del LES risalgono al 1971, sono stati poi rivisti nel 1982 e nuovamente revisionati nel 1997. Quelli attuali sono i criteri classificativi codificati dall'ACR (American College of Rheumatology), elaborati per assicurarsi che, nell'ambito degli studi clinici sul LES, i casi riportati in letteratura avessero effettivamente la malattia<sup>71</sup>. Anche se possono essere utilizzati come ausilio diagnostico, subiscono diverse limitazioni per il loro uso a tale scopo: sono stati realizzati e validati per la classificazione dei pazienti con malattia stabile di lunga durata, per i quali presentano un'elevata sensibilità (>85%) e specificità (>95%), ma possono escludere pazienti con malattia precoce o limitata a pochi organi, per i quali sensibilità e specificità sono significativamente più basse. Gli studi hanno dimostrato (e l'esperienza clinica lo conferma) che i criteri relativi alla nefrite lupica (proteinuria significativa, sedimento urinario attivo o evidenza di nefrite lupica alla biopsia renale), il rash discoide e le citopenie sono i più utili a stabilire la diagnosi di lupus<sup>72</sup>. Il lupus eritematoso sistemico è, infatti, una malattia caratterizzata da un'ampia varietà di manifestazioni cliniche e dal decorso imprevedibile e lo sviluppo dei singoli danni d'organo è asincrono, per cui i pazienti devono avere la malattia da anni prima di soddisfare tutti i criteri classificativi<sup>73</sup>.

Il lupus eritematoso sistemico può coinvolgere qualsiasi organo ed apparato, con manifestazioni simili a quelle di altre patologie e non esiste un test diagnostico

specifico. La diagnosi richiede, dunque, un'integrazione dei sintomi del paziente, dei reperti obiettivi e dei risultati dei test di laboratorio. Laddove sussista il sospetto clinico, un esame di screening ideale è rappresentato dalla ricerca sierologica degli anticorpi anti-nucleo (ANA), un test con elevata sensibilità (95% quando si usano colture di cellule umane come substrato) e facile da eseguire che, in caso di negatività, consente di escludere la diagnosi di LES ma, quando risulta positivo, non permette di fare diagnosi a causa della bassa specificità<sup>74</sup>. La titolazione degli ANA, infatti, può risultare positiva anche in altre condizioni morbose che determinano un coinvolgimento del sistema immunitario, come le infezioni, le neoplasie ed altre patologie autoimmuni. Specifici del LES sono invece gli anticorpi anti-dsDNA (DNA a doppia elica), che correlano con l'attività di malattia e soprattutto con la progressione del danno renale, per il quale si ritiene che essi rivestano un ruolo patogenetico diretto<sup>75</sup>. Gli anticorpi anti-Sm (antigene di Smith) sono rari ma patognomonicamente di LES; gli anticorpi anti-RNP (ribonucleoproteine) sono associati agli anti-Sm nel lupus, ma non sono specifici; gli anticorpi anti-Ro ed anti-La sono positivi soprattutto nel LES cutaneo; infine la presenza degli anticorpi antifosfolipidi è alla base di eventi trombotici venosi ed arteriosi e di morbidità in gravidanza (aborti ripetuti)<sup>76</sup>.

### **3.4 Manifestazioni cliniche e storia naturale**

Le manifestazioni cliniche del LES comprendono :

*Manifestazioni cutanee* : il coinvolgimento muco-cutaneo è quasi sempre presente nel LES, con lesioni lupus-specifiche (acute, subacute e croniche) e lesioni non lupus-specifiche. La lesione cutanea tipica consiste nel “butterfly rash”, che si presenta acutamente come una lesione eritematosa del volto, rilevata sulla cute, pruriginosa o dolorosa, con tipica distribuzione malare e scatenata dall'esposizione alla luce solare. Il rash malare costituisce un problema solo di natura estetica, dal momento che si risolve spontaneamente nel giro di giorni o settimane, senza lasciare cicatrici. Un'altra lesione cutanea acuta è l'eritema generalizzato, che si distribuisce largamente in diverse zone del corpo, interessando soprattutto la parte superiore del tronco. Anche in questo caso la lesione generalmente regredisce senza lasciare esiti, anche se rash acuti persistenti possono provocare teleangectasie permanenti<sup>77,78,79,80</sup>.

### *Manifestazioni muscolo-scheletriche*

L'impegno articolare è frequente e spesso costituisce il sintomo di esordio del LES, o può accompagnare le altre manifestazioni della malattia durante un flare. Si tratta per lo più di un'artrite non erosiva e non deformante, che ha una distribuzione simile all'artrite reumatoide, interessando prevalentemente le piccole articolazioni delle mani, i polsi e le ginocchia. I sintomi del paziente (dolore e rigidità) sono in genere sproporzionati rispetto alla gravità della sinovite presente all'esame obiettivo e la sinovite può essere transitoria, migrante e reversibile<sup>81, 82, 83</sup>.

### *Manifestazioni polmonari e pleuriche*

La manifestazione pleuropolmonare più comune è la pleurite, che rientra nel quadro delle sierositi LES-correlate: il dolore pleuritico è presente nel 45-60% dei pazienti e può essere o meno accompagnato da versamento<sup>84</sup>.

Altra manifestazione polmonare è la polmonite lupica acuta, definita come un processo polmonitico acuto febbrile in cui siano state escluse cause infettive<sup>85, 86</sup>.

Una complicanza rara ma potenzialmente fatale è l'emorragia alveolare diffusa, caratterizzata da emottisi, dispnea, ipossiemia ed anemia, con un quadro radiologico di infiltrati polmonari bilaterali diffusi<sup>87, 88</sup>.

### *Manifestazioni gastrointestinali ed epatiche*

Il coinvolgimento del tratto gastrointestinale e del fegato può avere eziopatogenesi sia malattia-correlata che iatrogena. Le manifestazioni più comuni sono la dispepsia, spesso sintomo di ulcera peptica, più comune nei pazienti trattati con FANS, ed il dolore addominale accompagnato da nausea e vomito, che può essere sintomo di peritonite, vasculite mesenterica con infarto intestinale, pancreatite e malattie infiammatorie intestinali<sup>89, 90, 91</sup>.

### *Linfadenopatia e splenomegalia*

Una linfadenopatia è presente in circa il 40% dei pazienti, di solito all'esordio o durante le riacutizzazioni. I linfonodi sono morbidi, non tesi, separati e in genere apprezzabili a livello cervicale, ascellare ed inguinale.

Anche la splenomegalia è frequente durante l'attività di malattia e non si associa necessariamente a citopenia. L'atrofia splenica e l'iposplenismo funzionale sono più rari, ma possono predisporre a gravi complicanze settiche<sup>92</sup>.

#### *Manifestazioni ematologiche*

Comprendono anemia, leucopenia e trombocitopenia<sup>93</sup>.

*Anemia:* correla con l'attività di malattia e può essere immuno-mediata o non immuno-mediata<sup>94</sup>.

*Leucopenia:* come l'anemia, correla con l'attività di malattia. Distinguiamo una linfopenia (<1500/mc), che può essere spiegata dalla presenza di anticorpi anti-linfociti, anticorpi anti-Ro e dalla terapia steroidea, e una neutropenia (<500/mc), determinata dalla presenza di anticorpi anti-neutrofili, dall'azione mielotossica di alcuni farmaci, dall'ipersplenismo e dalla disfunzione midollare<sup>95</sup>.

*Trombocitopenia:* consiste in genere in una moderata riduzione della conta piastrinica (100000-150000 piastrine/mc) e le cause più frequenti sono la distruzione immuno-mediata, il consumo dovuto all'anemia emolitica microangiopatica o all'ipersplenismo e i farmaci mielotossici. La trombocitopenia può essere anche il primo segno del LES, seguito da altri sintomi e segni negli anni successivi<sup>96</sup>.

#### *Manifestazioni neuropsichiatriche*

Il coinvolgimento del sistema nervoso centrale e periferico è comune nel LES e rimane una delle più importanti cause di morbidità e mortalità. L'American College of Rheumatology ha descritto 19 sindromi neuropsichiatriche (NPSLE-Neuropsychiatric Systemic Lupus Erythematosus), classificate in base all'interessamento del sistema nervoso centrale o periferico<sup>97</sup>.

I meccanismi implicati nella patogenesi del danno lupico neuropsichiatrico sono numerosi e correlano con la presenza di vasculopatia cerebrale, autoanticorpi e mediatori infiammatori. A causa dell'ampia variabilità delle manifestazioni neuropsichiatriche, non è facile porre diagnosi di NPSLE; per questo motivo è fondamentale condurre un'attenta anamnesi e servirsi degli esami di laboratorio e delle indagini strumentali adeguate per evidenziare alterazioni compatibili con il LES, sia primitive che secondarie.

### *Manifestazioni renali*

La nefrite lupica è evidente all'esame istologico nella maggior parte dei pazienti affetti da LES, anche in quelli senza segni clinici di malattia renale. Gli autoanticorpi rivestono un ruolo patogenetico importante: formano immunocomplessi circolanti che si depositano nei glomeruli o, alternativamente, legano antigeni espressi sulla membrana basale glomerulare, formando immunocomplessi in situ. Questi promuovono una risposta infiammatoria locale attivando il complemento e richiamando cellule infiammatorie. Il risultato dell'attività infiammatoria è il danno glomerulare, che si manifesta clinicamente con una sindrome nefritica o nefrosica di gravità variabile e potenzialmente progressiva fino all'insufficienza renale. È quindi mandatorio eseguire una biopsia renale nei pazienti con LES che hanno evidenza clinica o laboratoristica di nefrite attiva, specialmente se al primo episodio di nefrite, perché la diagnosi ed il trattamento precoce migliorano significativamente l'outcome renale<sup>98,99</sup>.

### *Indici di attività e di danno*

A causa della molteplicità delle manifestazioni cliniche non esiste un marker biologico che rifletta uniformemente l'attività di malattia. Ci si avvale, quindi, di scale di valutazione che combinano dati clinici e di laboratorio. Gli indici di attività di malattia attualmente utilizzati sono lo SLEDAI (Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index) e l' ECLAM (European Consensus Lupus Activity Measurements), come scores sistemici ed il BILAG (British Isles Lupus Assessment Group index), come score di valutazione di ogni singolo apparato coinvolto<sup>100</sup>. L'indice di danno è invece rappresentato dallo SLICC/ACR (Sistemic Lupus International Collaborating Clinics/ACR Damage index)<sup>101</sup>. Questi scores permettono di seguire l'evoluzione della malattia, stadiare la gravità, riconoscere precocemente i flares ed intervenire con la terapia più adeguata rispetto all'entità del danno e agli organi coinvolti.

### *Storia naturale della malattia*

Il lupus eritematoso sistemico ha un decorso cronico-recidivante, caratterizzato dall'alternanza di recidive ("flares") e remissioni, con un esito altamente variabile dalla remissione permanente alla morte. La fase preclinica della malattia è

contraddistinta dalla presenza di autoanticorpi, similmente a quanto si verifica nelle altre patologie autoimmuni, in assenza di segni o sintomi specifici; successivamente inizia una fase clinicamente evidente e malattia-specifica. Il danno precoce è legato prevalentemente all'attività di malattia, invece il danno tardivo –vale a dire infezioni, aterosclerosi accelerata e tumori maligni- è generalmente conseguenza di una malattia di lunga data e della terapia immunosoppressiva<sup>102</sup>. La morbidità correlata al trattamento non è facilmente distinguibile dalla morbidità legata alla malattia. Le infezioni rendono conto del 20-55% di tutte le morti nei pazienti con LES. La suscettibilità alle infezioni è attribuita alla disregolazione immunitaria e alla terapia, soprattutto alle alte dosi di corticosteroidi e di farmaci immunosoppressivi<sup>103</sup>. I pazienti con LES hanno un rischio 2.3-7.5 volte maggiore di sviluppare una coronaropatia rispetto ai controlli sani della stessa età. I tradizionali fattori di rischio sono rinforzati dai fattori di rischio legati alla malattia, tra cui gli anticorpi antifosfolipidi, che hanno effetto pro-trombotico, gli anticorpi anti-HDL, che interferiscono con l'attività di queste lipoproteine, il tipico pattern dislipidemico lupus-correlato (bassi livelli di HDL, alti livelli di trigliceridi, livelli normali o leggermente aumentati di LDL ed iperomocisteinemia) e l'effetto pro-aterogenico dell'infiammazione sistemica cronica<sup>104</sup>. L'attività di malattia incontrollata, la menopausa precoce, il deficit di vitamina D dovuto alla mancata esposizione alla luce solare e l'uso dei corticosteroidi per via sistemica contribuiscono alla ridotta densità minerale ossea nei pazienti con LES. Le fratture vertebrali sono comuni, soprattutto con l'avanzare dell'età<sup>105</sup>. Le neoplasie ematologiche, specialmente il linfoma non-Hodgkin (NHL) ed il tumore del polmone e della cervice uterina, sono più comuni nei pazienti con LES rispetto alla popolazione generale<sup>106</sup>. Di questa aumentata prevalenza rispondono sia meccanismi intrinseci del lupus che la terapia immunosoppressiva.

### **3.5 Terapia**

La terapia del LES dipende dalla gravità della malattia e dalle sue manifestazioni. Si può affermare che il corretto management della patologia dipende da tre fattori principali: la compliance del paziente, l'intensità della terapia basata sull'attività di malattia e l'associazione di più farmaci<sup>107</sup>. In generale, le manifestazioni cutanee,

quelle muscolo scheletriche e le sierositi rappresentano lo stadio più lieve della malattia, che può ricevere un trattamento di tipo “conservativo” con i FANS, con l'idrossiclorochina o con brevi cicli di steroidi. Al contrario, il coinvolgimento degli organi vitali, quali il SNC ed il rene, necessita di una immunosoppressione più aggressiva, che sfrutta il principio dell'associazione farmacologica. La terapia corticosteroidica è utile soprattutto nelle prime fasi di malattia, tuttavia deve essere associata ad altri farmaci, i DMARDs (Disease Modifying AntiRheumatic Drugs) che, per definizione, sono in grado di modificare il decorso della malattia e non solo di controllarne i sintomi. I DMARDs sono considerati a ragione i farmaci di fondo nella terapia del LES ed il loro impiego è utile anche per ridurre le dosi di steroidi, prevenendo così le complicanze legate alla terapia steroidea cronica (ipertensione arteriosa, diabete mellito, ulcera peptica, glaucoma/cataratta, osteoporosi)<sup>108</sup>. Almeno un farmaco di fondo deve essere impiegato nella terapia e la scelta dipende dalle manifestazioni cliniche della malattia: l'idrossiclorochina viene utilizzata soprattutto nelle forme lievi, ma si può sempre dare come farmaco di fondo: diversi studi hanno infatti dimostrato come il farmaco sia in grado di ridurre l'incidenza dei flares e di aumentare la sopravvivenza nei pazienti con LES<sup>109</sup>; il metotrexate è efficace nel controllo delle artriti, delle sierositi e delle vasculiti; micofenolato mofetile, ciclofosfamide e azatioprina sono i farmaci di elezione per la terapia della nefrite lupica, in associazione ai glucocorticoidi<sup>110</sup>; la terapia del LES neuropsichiatrico può variare dal controllo dei sintomi con i FANS, in caso di vasculopatia cerebrale, alla terapia anticoagulante in caso di trombosi associata alla sindrome da anticorpi anti-fosfolipidi, ai farmaci immunosoppressori per controllare l'infiammazione<sup>111</sup>. Nelle forme gravi di LES può essere necessario ricorrere alla plasmateresi o alla somministrazione di immunoglobuline per via endovenosa, fino al trapianto autologo di cellule staminali, ma ciò è possibile solo in casi selezionati<sup>112</sup>. Nuove opzioni di trattamento sono i farmaci biologici Rituximab, un anticorpo monoclonale anti-CD20 e Belimumab, da poco in commercio in Italia, un anticorpo monoclonale anti-Blys<sup>113</sup>. Non esiste, quindi, una terapia standard per il lupus, ma è comunemente riconosciuto che i pazienti devono essere trattati in modo aggressivo durante le riacacerbazioni della malattia, per prevenire conseguenze irreversibili. È inoltre importante trattare anche le comorbidità: infezioni, ipertensione arteriosa, diabete, dislipidemia; la fotoprotezione è ovviamente indicata per i pazienti con sintomi cutanei<sup>114</sup>.



## ***4. Danno cardiovascolare nel LES : stato dell'arte***

### **4.1 Epidemiologia e patogenesi del danno cardiovascolare nel LES**

Il coinvolgimento cardiaco in corso di LES è decisamente frequente: da studi recenti condotti con l'ausilio di strumenti diagnostici molto sensibili, come l'ecocardiografia ed il metodo doppler, è emerso che oltre il 50% dei pazienti affetti da lupus presenta un interessamento cardiaco<sup>115</sup> (figura 6). La patogenesi del danno cardiovascolare non è certa, ma si ritiene che gli autoanticorpi e l'infiammazione sistemica rivestano un ruolo fondamentale<sup>116</sup>. Le patologie cardiache che si riscontrano più frequentemente sono la pericardite, l'aterosclerosi precoce e l'endocardite verrucosa (o endocardite di Libman e Sacks); la miocardite, le aritmie e le anomalie di conduzione sono rare; l'arterite coronarica è un evento eccezionale nel lupus<sup>117</sup>. Inoltre è importante considerare che, in seguito all'allungamento della vita secondario all'introduzione delle moderne terapie immunosoppressive, le lesioni cardiache hanno modo di svilupparsi nella maggior parte dei pazienti.

Degno di nota, a causa del frequente interessamento cardiaco, è il lupus neonatale, una patologia autoimmune trasmessa dalla madre al feto attraverso il passaggio degli autoanticorpi per via transplacentare. Manifestazioni transitorie e permanenti fanno parte del quadro clinico: le cardiopatie appartengono alle manifestazioni permanenti, che possono condizionare la prognosi del neonato. Le complicanze cardiache più frequenti sono le cardiomiopatie ed il blocco atrioventricolare congenito, che può associarsi a malformazioni cardiache complesse. Il blocco atrio-ventricolare congenito può essere di I, II o III grado e si manifesta con bradicardia<sup>118</sup>. La terapia con desametasone è consigliata nei blocchi di I e di II grado, perché la regressione a ritmo sinusale è possibile; è sconsigliata invece nel blocco di III grado, perché non sono stati descritti casi di remissione. L'80% dei neonati affetti da blocco cardiaco congenito di III grado decede e, ovviamente, i sopravvissuti devono essere sottoposti ad impianto di pacemaker<sup>119</sup>.

## 4.2 Pericardite

La pericardite è la manifestazione cardiaca più comune nel lupus, sebbene spesso non sia clinicamente evidente. Gli studi ecocardiografici hanno dimostrato una prevalenza del 20-50% e gli studi autoptici hanno documentato un interessamento pericardico in più del 60% dei pazienti<sup>120</sup>. La patologia può manifestarsi in modo tipico, con dolore toracico, in genere aggravato dal clinostatismo e dall'inspirazione profonda, e dispnea, ma la maggior parte dei pazienti presenta un versamento pericardico da lieve a moderato del tutto asintomatico. Nei casi sintomatici il paziente può avere febbre e tachicardia ed occasionalmente all'auscultazione cardiaca si possono apprezzare rumori di sfregamento, che scompaiono entro poche ore, contestualmente alla formazione del versamento pericardico<sup>121</sup>. Il tamponamento cardiaco è raro, ma può rappresentare una modalità di esordio della patologia<sup>122</sup>, ed ancor più rara è la pericardite costrittiva<sup>123</sup>. Nella pericardite lupica il versamento è un essudato: studi biochimici e di immunofluorescenza hanno riscontrato la presenza di leucociti (principalmente granulociti neutrofili), anticorpi anti-DNA e fattori del complemento ridotti. Si ritiene, quindi, che la causa della pericardite nel lupus sia il deposito di immunocomplessi ed il consumo dei fattori del complemento in un quadro di flogosi sistemica, che è la caratteristica principale della patologia primitiva<sup>124</sup>. In presenza di un sospetto clinico di pericardite, la diagnosi può essere confermata dai reperti elettrocardiografici: sopraslivellamento (a concavità superiore, detto anche "a sella") del tratto ST in quasi tutte le derivazioni ed inversione dell'onda T successivamente alla normalizzazione del tratto ST. L'ecocardiografia è un altro metodo diagnostico valido e sensibile, che mostra la raccolta fluida o l'ispessimento del pericardio<sup>125</sup>.

La pericardite lupica risponde precocemente ai corticosteroidi e solo occasionalmente si verifica una progressione rapida verso il tamponamento cardiaco<sup>126</sup>. I FANS possono essere impiegati nella terapia della pericardite lieve; il tamponamento cardiaco necessita, invece, di pericardiocentesi ed i casi refrattari possono beneficiare della creazione di una finestra pericardica (pericardiectomia)<sup>127</sup>.

### 4.3 Aterosclerosi accelerata

Nonostante l'aumento dell'aspettativa di vita, i pazienti con lupus eritematoso sistemico sono ancora oggi considerati a rischio di morte prematura<sup>128</sup>: infatti, il rischio di eventi cardiovascolari (CV) è 5-6 volte maggiore rispetto alla popolazione generale e le giovani donne tra i 35 ed i 44 anni hanno un rischio 50 volte maggiore di infarto del miocardio (MI) rispetto ai controlli sani di pari età<sup>129</sup>.

Il meccanismo eziopatogenetico alla base di questi eventi vascolari è l'aterosclerosi accelerata<sup>130</sup>. Sebbene i tradizionali fattori di rischio CV (sesso maschile, età avanzata, ipercolesterolemia, ipertensione arteriosa, diabete mellito, fumo di sigaretta, obesità) contribuiscano all'aterosclerosi, non possono spiegare completamente l'elevata prevalenza della patologia cardiovascolare nei pazienti con lupus. Infatti, dopo il controllo dei fattori di rischio tradizionali, nei pazienti con lupus persiste ancora un rischio elevato di sviluppare una patologia coronarica. Ciò suggerisce la presenza di altri fattori, lupus-correlati, in grado di influenzare questa tendenza all'aterosclerosi precoce. Il LES è una patologia infiammatoria sistemica e l'infiammazione riveste un ruolo centrale nella formazione e nella crescita della placca ateromastica<sup>131</sup>: è quindi evidente che l'infiammazione ed i meccanismi immunitari partecipano alla patogenesi dell'aterosclerosi nel lupus<sup>132</sup>.

Numerosi studi hanno dimostrato che la prevalenza dei tradizionali fattori di rischio cardiovascolari è maggiore nei pazienti affetti da lupus rispetto ai controlli sani<sup>133</sup>. I primi presentano infatti un profilo lipidico aterogenico, con elevate concentrazioni plasmatiche di colesterolo totale, trigliceridi, lipoproteine a bassa densità (LDL), lipoproteine a densità molto bassa (VLDL) e lipoproteina a [Lp(a)], e bassi livelli di lipoproteine ad alta densità (HDL)<sup>134</sup>. Oltre ad una ridotta concentrazione plasmatica di HDL, si osserva anche un'alterata funzione di queste lipoproteine: in condizioni normali, il colesterolo HDL è una molecola con attività anti-infiammatoria, che previene la formazione delle LDL ossidate (ox-LDL) e delle cellule schiumose, ostacolando in questo modo l'apposizione di materiale aterogenico nella parete del vaso. Una HDL pro-infiammatoria (pi-HDL), invece, non è in grado di prevenire l'ossidazione delle LDL: la pi-HDL si trova più frequentemente nei pazienti con lupus e patologia cardiovascolare che in quelli senza patologia coronarica<sup>135</sup>.

Nei pazienti con lupus l'ipertensione arteriosa ha una prevalenza che varia dal 35 al 74% nei diversi studi ed è considerata il fattore di rischio principale per la

progressione della patologia renale e cardiovascolare<sup>136</sup>. La patogenesi dell'ipertensione nel LES è multifattoriale e la ridotta funzione renale, conseguente al danno glomerulare immuno-mediato, svolge un ruolo centrale, determinando la riduzione del filtrato glomerulare e l'aumento della volemia. Nel lupus è attivo anche il sistema renina-angiotensina-aldosterone (RAS), come dimostrato dalla presenza di livelli plasmatici di renina aumentati e dall'efficacia del controllo della pressione arteriosa con gli ACE inibitori<sup>136</sup>. L'endotelina-1 è un potente vasocostrittore e favorisce la ritenzione renale di sodio: i suoi livelli plasmatici sono elevati nei pazienti con lupus e l'evidenza clinica suggerisce che possa essere implicata nella progressione dell'ipertensione arteriosa.

Inoltre, diversi fattori metabolici possono contribuire alla patofisiologia dell'ipertensione arteriosa: leptina, insulino-resistenza ed obesità. L'obesità, l'insulino-resistenza ed il diabete mellito non insulino-dipendente hanno una prevalenza maggiore nei pazienti con LES rispetto alla popolazione generale e ciò è, almeno in parte, riconducibile all'utilizzo della terapia corticosteroidica, che favorisce l'obesità addominale, e all'infiammazione/autoimmunità, che alterano la regolazione del metabolismo glucidico.

Studi condotti su ampie coorti di pazienti hanno dimostrato che una patologia di lunga durata e un indice di attività di malattia elevato (misurato con lo SLICC) rappresentano fattori di rischio indipendenti per lo sviluppo dell'aterosclerosi<sup>137</sup>.

Come affermato in precedenza, il lupus eritematoso sistemico è caratterizzato dalla produzione di auto-anticorpi, evento patogenetico fondamentale, ma una reazione immune coinvolgente gli anticorpi partecipa anche alla modulazione dell'aterosclerosi: gli anticorpi anti ox-LDL si associano alla mortalità CV nella popolazione generale, tuttavia, la correlazione non è lineare e ciò rende il profilo anticorpale difficile da utilizzare come fattore di rischio indipendente.

Nei pazienti con LES, la prevalenza degli anticorpi anti-cardiolipina è del 24-39% e quella degli anticorpi anti-fosfolipidi è del 15-30%, ma solo il 50% degli individui con anticorpi anti-fosfolipidi manifesta un evento clinico (trombosi arteriosa o venosa o morbidità in gravidanza), quindi ha una sindrome da anticorpi anti-fosfolipidi (APS).

Le citochine pro-infiammatorie (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, INF- $\alpha$ ) partecipano al reclutamento delle cellule infiammatorie (monociti e linfociti T) nella parete dei vasi, stimolando l'espressione delle molecole di adesione sulle cellule endoteliali. Queste citochine sono

prodotte in grandi quantità nel corso della patologia e, quindi, appare chiara la correlazione tra lupus ed aterosclerosi anche da questo punto di vista. Inoltre, la IL-6 causa l'aumento dei livelli plasmatici di proteina C reattiva (PCR), un marker di infiammazione che si associa all'infarto del miocardio ed allo stroke cerebrale nella popolazione generale.

L'iperomocisteinemia è frequente nei pazienti con lupus: si ritiene che l'omocisteina sia una tossina capace di danneggiare l'endotelio, favorendo la formazione dell'ateroma; diversi studi sono giunti alla conclusione che l'iperomocisteinemia rappresenta un fattore di rischio cardiovascolare indipendente e la sua determinazione nei pazienti con LES può essere utile a valutare la presenza e l'estensione della patologia aterosclerotica subclinica.

Un gran numero di farmaci impiegati nella terapia del lupus incide sul profilo di rischio cardiovascolare: i FANS aumentano il rischio di eventi cardiovascolari ed il loro uso deve essere modulato sulla base del rischio CV globale di ciascun paziente; gli effetti della terapia steroidea non devono essere sottovalutati perché, sebbene rappresenti una delle terapie più efficaci per il controllo dell'attività di malattia, ha numerose conseguenze metaboliche, tra cui l'aumento del peso corporeo e della pressione arteriosa e l'alterazione del profilo glucidico e lipidico. Sembra che l'effetto metabolico dei glucocorticoidi sia dose-dipendente e questo spiega il tentativo da parte dei clinici di ottenere il controllo della patologia con la dose di steroidi più bassa possibile (*steroid sparing therapy*). L'uso del metotrexate, al contrario, si associa alla riduzione del rischio CV; l'idrossiclorochina ha dimostrato un effetto protettivo simile, aumentando inoltre la sopravvivenza globale.

In conclusione, la prevenzione degli eventi cardio- e cerebro-vascolari nei pazienti con lupus richiede il controllo dei fattori di rischio sia tradizionali che lupus-specifici: per quanto concerne questi ultimi, sicuramente la terapia con i DMARDS e con i farmaci biologici è efficace nel controllo del fattore di rischio principale, cioè l'infiammazione sistemica.

#### **4.4 Endocardite di Libman-Sacks**

La patologia valvolare è una comune manifestazione del lupus eritematoso sistemico: studi ecocardiografici hanno dimostrato che la sua prevalenza è maggiore del 50%<sup>138</sup>.

L'endocardite di Libman e Sacks (altrimenti nota come endocardite verrucosa, marantica o trombotica non batterica) è stata descritta per la prima volta nel 1924 come un'endocardite atipica, sterile, con vegetazioni verrucose, che mimava clinicamente un'endocardite batterica<sup>139</sup>.

La patogenesi non è conosciuta, tuttavia gli anticorpi antifosfolipidi si associano spesso alle lesioni valvolari. Questi autoanticorpi sono diretti contro i fosfolipidi presenti sulla membrana delle cellule endoteliali. Nonostante gli studi immunoistologici suggeriscano un ruolo patogenetico degli anticorpi antifosfolipidi, una simile prevalenza e gravità della patologia valvolare sono state descritte nei pazienti con LES negativi per questi anticorpi<sup>140</sup>.

La valvola mitrale è quella più frequentemente coinvolta dalle lesioni infiammatorie, seguita dalla valvola aortica, ma potenzialmente tutte e quattro le valvole cardiache ed anche l'endocardio parietale possono essere interessati dalle lesioni. Le anomalie riscontrate all'ecocardiografia consistono in vegetazioni, diffuso assottigliamento dei lembi valvolari, insufficienza valvolare e, meno frequentemente, stenosi.

La maggior parte delle lesioni è clinicamente silente, tuttavia, quando la disfunzione valvolare è grave, si può manifestare un'insufficienza cardiaca potenzialmente fatale. I fenomeni embolici, conseguenti al distacco di frammenti dalle vegetazioni sterili, e l'endocardite infettiva secondaria possono complicare il quadro clinico e causare manifestazioni ischemiche neurologiche e sistemiche. L'insufficienza valvolare e la più rara stenosi possono infine causare aritmie, come la fibrillazione atriale.

L'ecocardiografia è la tecnica di imaging più appropriata per fare una diagnosi precoce e accurata: la modalità transesofagea è, in termini di sensibilità, migliore di quella transtoracica nel rilevare lesioni valvolari compatibili con un'endocardite da lupus; tuttavia, la diagnosi definitiva richiede l'esame istopatologico della valvola, che mostra la presenza di depositi di fibrina, organizzazione fibroelastica, neovascolarizzazione, immunocomplessi ed infiltrazione di cellule mononucleate.

Il trattamento dell'endocardite di Libman e Sacks dipende dal tipo e dalla gravità delle manifestazioni cliniche. La disfunzione valvolare emodinamicamente significativa può essere trattata in modo conservativo in taluni pazienti (ACE-inibitori, beta-bloccanti, diuretici, immunosoppressori, anticoagulanti, farmaci per la profilassi dell'endocardite). L'uso degli steroidi è tuttora controverso: secondo alcuni autori essi non preverrebbero l'endocardite, ma faciliterebbero la guarigione delle lesioni

riducendo l'infiammazione ed il danno valvolare. Inoltre, la terapia steroidea può ridurre l'attività di malattia, che sembra essere correlata con il rischio di sviluppare l'endocardite verrucosa. D'altra parte, è ben noto che gli steroidi promuovono la fibrosi, la cicatrizzazione e l'assottigliamento dei tessuti, potendo in tal modo causare un ulteriore danno valvolare. Un case report attesta la rapida comparsa di una grave insufficienza mitralica (documentata all'ecocardiografia) in un paziente con lupus cui erano state somministrate alte dosi di steroidi per il controllo di un flare<sup>141</sup>.

Se i sintomi della disfunzione valvolare persistono, può essere necessario intervenire chirurgicamente sulla valvola danneggiata. Non c'è unanimità riguardo la procedura chirurgica da seguire in questi casi: la cardiocirurgia moderna sostiene la superiorità dell'intervento conservativo di riparazione valvolare, perché si associa ad una migliore conservazione della funzione del ventricolo sinistro e ad un minor numero di complicanze valvolari. Tuttavia, l'intervento di rimozione e sostituzione valvolare resta il gold standard della terapia chirurgica poiché elimina in modo definito il rischio di recidive, che al contrario possono verificarsi in caso di intervento conservativo, obbligando il paziente a sottoporsi ad un nuovo intervento chirurgico<sup>142,143</sup>.

## ***5. Parte sperimentale***

### **5.1 Scopo dello studio**

Lo scopo del nostro progetto è stato quello di valutare la correlazione esistente tra ipovitaminosi D e disfunzione diastolica pre-clinica in pazienti affetti da LES mediante valutazione ecocardiografica (ecocardiogramma transtoracico color-Doppler) e dosaggio dei livelli sierici di vitamina D. Si tratta di uno studio pilota, spontaneo, nato dalla collaborazione tra il nostro Dipartimento di Cardiologia e il Dipartimento di Medicina Interna/Reumatologia.

### **5.2 Materiali e metodi**

Nel periodo compreso tra Novembre 2015 e Ottobre 2018 sono stati arruolati 50 pazienti afferenti alla “Lupus Clinic” del Dipartimento di Medicina Interna e Specialità Mediche - Reumatologia (ambulatorio specificamente dedicato alla diagnosi e terapia del LES) che hanno dato il loro consenso alla ricerca e che soddisfacevano i criteri di inclusione/esclusione. Relativamente alla finestra temporale di inclusione dei pazienti, la eventuale variabilità stagionale dei livelli plasmatici di vitamina D che si può osservare nella popolazione generale (correlata alla maggiore esposizione solare – e dunque maggiore sintesi vitaminica nei mesi estivi) non è significativa nella coorte di pazienti selezionati, in quanto tra le misure terapeutiche comportamentali del lupus rientra specificamente la non esposizione alla luce solare.

#### Criteri di inclusione:

- età >18 anni e < 40 anni;
- diagnosi di Lupus Eritematoso Sistemico secondo i criteri classificativi ACR del 1997;



- deficit di vitamina D (concentrazione plasmatica 25-OH-vit.D < 30 ng/ml);
- consenso informato scritto.

Criteri di esclusione: (definiti al fine specifico di escludere, nell'arruolamento, pazienti che fossero affetti da altra condizione fisiopatologica/clinica che, già di per se stessa, potesse giustificare una carenza di colecalciferolo)

- età <18 anni e > 40 anni;
- BMI > 25 (l'obesità sembra favorire il deficit di vitamina D per verosimile sequestro della molecola nel tessuto adiposo)<sup>144</sup>;
- donne in condizione di menopausa;
- insufficienza renale cronica (valori di GFR < 90 ml/min calcolato con formula MDRD);
- qualunque patologia cardiovascolare e non capace di determinare disfunzione diastolica (in particolare sono stati esclusi pazienti con cardiopatia ipertensiva, cardiopatia ischemica, valvulopatia, cardiomiopatie primitive, danno cardiaco LES-indotto già noto, ipertensione arteriosa polmonare);
- presenza di sintomi di verosimile genesi cardiogena (angor, dispnea, cardiopalmo, sincope, edemi declivi, turgore giugulare);
- Terapia biologica : i pazienti non dovevano assumere al momento dell'arruolamento, né aver assunto in precedenza, terapia specifica con farmaci biologici;
- Assenza di terapia sostitutiva in atto/pregressa per carenza vitaminica D.

### **5.3 Valutazione sierologica**

Tutti i pazienti arruolati sono stati sottoposti a prelievo di sangue venoso da vena periferica per la valutazione dei livelli sierici di vitamina D e degli autoanticorpi. I campioni di siero ottenuti da ogni paziente sono stati aliquotati e conservati a -80°C fino al momento del loro utilizzo. La valutazione della vitamina D è stato effettuata mediante dosaggio del 25-OH-calciferolo con metodica di chemiluminescenza.

## 5.4 Valutazione ecocardiografica

Tutti i pazienti sono stati sottoposti ad esame ecocardiografico transtoracico completo (M-mode, B-Mode, color-Doppler, TDI, Speckle Tracking) nel quale sono stati valutati i parametri di funzione sistolica e diastolica. Relativamente alla funzione sistolica, è stata utilizzata la valutazione quantitativa della frazione di eiezione mediante calcolo del volume telediastolico e telesistolico ventricolare sinistro attraverso il metodo di Simpson monoplano e lo Speckle Tracking. Per quanto attiene lo studio della funzione diastolica, sono stati acquisiti tutti i parametri fondamentali per la stima delle pressioni di riempimento del ventricolo sinistro in accordo con le linee guida EAE/ASE 2009 (European Association of Echocardiography/American Society of echocardiography)<sup>145</sup>. In particolare, sono stati acquisiti ed analizzati :

- volume atriale sinistro : la misurazione del volume dell'atrio sinistro è stata ottenuta dalla proiezione apicale 4 camere e successivamente indicizzata per la superficie corporea. E' noto da numerosi studi che esiste una relazione significativa tra rimodellamento atriale e indici ecocardiografici di funzione diastolica, in quanto, mentre l'analisi delle velocità Doppler e gli intervalli di tempo riflettono le pressioni di riempimento al momento della misurazione stessa, le dimensioni dell'atrio sinistro sono la memoria degli effetti di alte pressioni di riempimento protratte nel tempo. In particolare, è comunemente accettato in letteratura che un volume atriale indicizzato  $> 34 \text{ ml/m}^2$  sia un predittore indipendente di morte cardiovascolare, insufficienza cardiaca, fibrillazione atriale e ictus cerebri cardioembolico. Pertanto, in assenza di vizio valvolare mitralico, le dimensioni dell'atrio sinistro costituiscono un vero e proprio "barometro" della funzione diastolica<sup>146</sup>;

- pressione arteriosa sistolica polmonare (PAPs) : in assenza di patologia polmonare, un aumento della PAPs può essere indicativo di elevate pressioni di riempimento in ventricolo sinistro. In tutti i pazienti sono stati valutati il picco di velocità del rigurgito valvolare tricuspidalico mediante Doppler continuo e il calibro e la collassabilità della vena cava inferiore al fine di ottenere una stima indiretta della PAPs<sup>147</sup>;

- afflusso mitralico mediante Doppler pulsato : il Doppler pulsato è stato eseguito in proiezione apicale 4 camere per ricavare le velocità di afflusso mitralico, posizionando il volume campione in corrispondenza del “tips” dei lembi valvolari mitralici, ottimizzando il gain spettrale. Sono stati pertanto misurati il picco di velocità dell’onda E (riempimento precoce) e dell’onda A (riempimento tardivo), il rapporto E/A ed il DT (tempo di decelerazione); questi due ultimi parametri (E/A e DT) identificano i diversi pattern di riempimento ventricolare sinistro (normale, alterato rilasciamento, pseudo normale e restrittivo). Dato che i parametri derivabili dallo studio Doppler pulsato dell’inflow mitralico si modificano con l’avanzare dell’età (la velocità E e il rapporto E/A si riducono, mentre il DT e la velocità A aumentano), sono stati esclusi dallo studio pazienti di età superiore ai 40 anni. Va specificato che la velocità dell’onda E riflette primariamente il gradiente pressorio tra atrio e ventricolo sinistro nella fase precoce della diastole, essa è influenzata dal precarico e da possibili alterazioni del rilasciamento ventricolare sinistro; analogamente, la velocità dell’onda A, che corrisponde al gradiente pressorio tra atrio e ventricolo sinistro durante la fase tardiva della diastole, è influenzata dalla compliance del ventricolo sinistro e dalla funzione contrattile atriale<sup>148</sup>. Al fine di superare tali limitazioni della metodica Doppler pulsato, tutti i pazienti sono stati sottoposti anche a studio con Doppler TDI e Speckle Tracking (vedere seguito);

- TDI (Tissue Doppler Imaging) : è stato eseguito dalla proiezione apicale 4 camere al fine di campionare le velocità dell’anello mitralico; il volume campione è stato posizionato in corrispondenza (o entro 1 cm) dall’inserzione settale e laterale dei lembi valvolari mitralici, (settando la scala di velocità Doppler a 20 cm/s), e valutando, quindi, il movimento sistole-diastolico globale del ventricolo sinistro. In questo modo è possibile, infatti, registrare un’onda diastolica precoce denominata “e” ed un’onda diastolica tardiva denominata “a” che forniscono informazioni sulla funzione ventricolare longitudinale con il vantaggio di avere una sostanziale indipendenza dal pre-carico ventricolare<sup>149</sup>. E’ stato quindi possibile calcolare il rapporto e/e’ che costituisce un indice in grado di predire le pressioni di riempimento in ventricolo sinistro; con riferimento al rapporto e/e’ settale, infatti, un rapporto inferiore a 8 indica normali pressioni di riempimento ventricolare sinistro, mentre un rapporto superiore a 15 è associato ad un aumento di tali pressioni (quando il valore del rapporto è tra 8 e

15 si ricade in una “fascia grigia” in cui è necessaria l’integrazione con gli altri parametri di studio della funzione diastolica). Inoltre, l’indice  $e/e'$  ben si presta allo studio della popolazione in oggetto che è costituita da pazienti che non esibiscono disfunzione sistolica, in quanto vari studi hanno indicato che in pazienti con normale frazione di eiezione il rapporto  $e/e'$  esibisce la migliore correlazione non solo con le pressioni di riempimento ma anche con gli indici invasivi di stiffness ventricolare sinistra (l’onda  $e'$ , infatti, risulta essere inversamente correlata alla percentuale di fibrosi interstiziale miocardica - identificata mediante biopsia endomiocardica - che contribuisce in maniera significativa all’alterazione della diastole). Va, ovviamente, ricordato che la metodica TDI presenta comunque dei limiti tecnici, tra cui l’angolo-dipendenza, la limitata risoluzione spaziale cui consegue l’impossibilità di differenziale le velocità subendocardiche da quelle subepicardiche e il gradiente base-apice delle velocità stesse;

- Speckle Tracking : costituisce una nuova metodica ecocardiografica che permette la valutazione non invasiva della funzione globale e regionale del ventricolo sinistro tramite analisi off-line di immagini ecocardiografiche bidimensionali<sup>150</sup>. Il termine “speckle tracking” significa, letteralmente, un sistema in grado di seguire gli speckle, ossia i punti bianchi e neri che costituiscono l’immagine ecocardiografica; situati in modo random, essi sono markers acustici uniformemente distribuiti nel miocardio e derivano dal frutto dell’interazione degli ultrasuoni col tessuto miocardico (gli speckle, inoltre, possono essere riconosciuti nell’ambito di una intera regione di interesse definita “kernel”). Prima dell’introduzione di questa sofisticata tecnica ecocardiografica la deformazione miocardica poteva essere studiata solo mediante RMN cardiaca; ora è invece possibile analizzare il displacement delle pareti miocardiche nelle tre direzioni dello spazio. Nell’ambito della deformazione miocardica, infatti, possiamo distinguere diverse componenti : accorciamento longitudinale delle fibre subendocardiche, accorciamento circonferenziale delle fibre subepicardiche, ispessimento sistolico parietale e torsione (ossia rotazione sistolica antioraria dell’apice e oraria della base sull’asse lungo del ventricolo sinistro). Pertanto, tramite l’analisi Speckle Tracking, è possibile derivare diversi parametri : il displacement (distanza percorsa da uno speckle durante il ciclo cardico), la velocità (ossia il suddetto displacement corretto per l’unità di tempo), lo “strain” (deformazione

miocardica, cioè il cambiamento frazionale della lunghezza di un segmento miocardico), lo “strain rate” (tasso di modificazione dello strain), la “torsion” (movimento torsionale del ventricolo sinistro). Il vantaggio fondamentale insito nella metodica, in confronto con il TDI, è la totale angolo-indipendenza della valutazione eseguita. In particolare, nel nostro studio è stato utilizzato lo strain longitudinale, che esprime l'accorciamento in sistole delle fibre subendocardiche dalla base all'apice; la riduzione dello spazio tra due diversi Kernel produce infatti una curva di strain con un picco negativo. Il global longitudinal strain è stato oramai validato come parametro di funzione ventricolare sinistra ed è stato quello adottato nel nostro protocollo in quanto, dai dati presenti in letteratura, risulta essere in parametro maggiormente riproducibile e quindi più attendibile rispetto agli altri parametri di strain. L'analisi di Speckle Tracking è stata eseguita su immagini ecocardiografiche bidimensionali in scala di grigi, acquisite durante apnea per minimizzare gli spostamenti correlati agli atti del respiro e in modalità sincronizzata con la traccia elettrocardiografica (tutti i pazienti inclusi erano in ritmo sinusale e le immagini sono state acquisite in 3 cicli consecutivi); per ottimizzare l'acquisizione è stato settato un alto frame-rate (compreso tra 60 e 110 Hz, cercando di impostare un valore proporzionale alla frequenza cardiaca del paziente); le proiezioni utilizzate sono state la apicale 4-camere, apicale 2-camere e apicale 3-camere. L'analisi è stata eseguita off-line con modalità semi-automatica mediante software dedicato (software 2D CPA Tomtec). In particolare, si è proceduto alla traccia del bordo endocardico nella maniera più precisa possibile; il software, poi, ha diviso automaticamente in sei segmenti la regione di interesse. Sono state pertanto ricavate delle curve specifiche per ogni segmento.

## **5.5 Raccolta dati**

I dati demografici, clinici e sierologici sono stati raccolti in una cartella clinica elettronica standardizzata. Il database include dati clinici, demografici, sierologici, e anamnestici riguardanti la storia clinica pregressa del paziente; le comorbidità (incluse patologie autoimmuni organo-specifiche); tutti i dati ecocardiografici raccolti. Le manifestazioni cliniche sono state elencate secondo i criteri classificativi per il LES (criteri ACR revisionati nel 1997). Sono state inoltre riportate le terapie pregresse e

concomitanti. I dati sierologici comprendono : livelli sierici di vitamina D, valori di C3 e C4, velocità di eritrosedimentazione (VES), proteina C reattiva (PCR) e autoanticorpi (ANA, anti-dsDNA, anti-ENA, anti-cardiolipina, anti-beta2 GPI, LAC). L'attività di malattia è stata misurata attraverso il *Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index* 2000 (SLEDAI 2K); come indice di cronicizzazione di malattia è stato utilizzato lo SLICC/ACR Damage Index (SDI). I pazienti inclusi sono risultati essere omogenei per attività di malattia/indice di cronicizzazione e per terapia farmacologica.

## **5.6 Analisi statistica**

L'analisi statistica è stata effettuata usando un software SPSS (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). Le variabili continue sono state espresse come media di deviazione standard, mentre le variabili discrete sono state espresse come percentuale. Il test statistico utilizzato è stato il test non parametrico di Mann Whithney per le variabili continue. Sono stati considerati statisticamente significativi valori di  $p < 0.05$ .

## **5.7 Risultati**

La nostra popolazione di studio è composta da 50 pazienti, tutte di sesso femminile (questo è legato alla prevalenza praticamente esclusiva del LES nelle donne rispetto agli uomini). L'età media è di  $32,5 \pm 7$  anni. L'anamnesi cardiologica risulta negativa per patologia cardiovascolare e/o assunzione di terapia medica cardiologica nell'intero campione. Tutte le pazienti risultano omogenee per indici di malattia cronica e terapia farmacologica non cardiovascolare; tutte le pazienti sono state sottoposte a studio ecocardiografico completo come precedentemente specificato, e a dosaggio plasmatico della 25-OH-vitamina D. Il valore medio della vitamina D è risultato  $15,27 \pm 7$  ng/ml. Le caratteristiche cliniche descrittive del campione sono esposte in maniera integrale nella figura 7.

Eseguita la raccolta dati, al fine di individuare una correlazione tra livelli plasmatici di vitamina D e segni pre-clinici di disfunzione diastolica si è pensato di suddividere la popolazione in oggetto in due gruppi in funzione della severità della ipovitaminosi

rilevata agli esami ematochimici; è stato pertanto individuato un primo gruppo (gruppo 1) di 23 pazienti con insufficienza vitaminica (concentrazione plasmatica 20-30 ng/ml) e un secondo gruppo (gruppo 2) di 27 pazienti con carenza vitaminica (concentrazione plasmatica < 20 ng/ml); tali range sono stati desunti dalle relative linee guida sulla definizione clinica dei valori di vitamina D<sup>151</sup>. Correlando i parametri ecocardiografici con tali valori ematochimici, è stata raggiunta la significatività statistica relativamente ai seguenti indici di funzione diastolica (figure 8 e 9) :

- velocità onda A al Doppler pulsato transmitralico : nel gruppo 1 il valore medio è risultato essere 54,4 cm/s mentre nel gruppo 2 è risultato essere 71 cm/s ( $p < 0,001$ ), ad indicare che le pazienti con più grave deficit vitaminico esibiscono una componente tardiva di riempimento ventricolare sinistro più evidente;

- E/E' settale (valore normale : < 8): nel gruppo 1 il valore medio è risultato essere 8,1 mentre nel gruppo 2 è risultato essere 13,6 ( $p = 0,009$ ), ad indicare che mentre le pazienti con insufficienza vitaminica hanno pressioni di riempimento che si possono considerare ai limiti superiori della norma, quelle con carenza vitaminica ricadono in quell'ambito di "fascia grigia" (rapporto E/E' 9-14) che potrebbe essere compatibile, come verosimilmente confermato dai successivi dati, con un aumento delle pressioni di riempimento del ventricolo sinistro;

- volume atriale sinistro indicizzato per la superficie corporea (valore normale : < 28 ml/m<sup>2</sup>) : nel gruppo 1 il valore medio è risultato essere 27,7 ml/m<sup>2</sup> mentre nel gruppo 2 è risultato essere 34,3 ml/m<sup>2</sup> ( $p = 0,009$ ), ad indicare che le pazienti con più grave deficit vitaminico vanno incontro ad un più marcato rimodellamento atriale che è indice di una più importante alterazione della fase diastolica (nessuna delle pazienti presenta vizi valvolari tali da inficiare il significato di tale dato).

- DT (tempo di decelerazione dell'onda E mitralica; valore normale relativo alla fascia di età delle pazienti incluse :  $166 \pm 14$  msec): nel gruppo 1 il valore medio è risultato essere 190 msec mentre nel gruppo 2 è risultato essere 218 ( $p = 0,047$ ), a ulteriore conferma del maggiore impatto di una carenza vitaminica sulla funzione diastolica.

Dall'analisi dei dati è inoltre emersa una differenza in termini di funzione sistolica; mentre il calcolo del global longitudinal strain non ha mostrato differenze significative tra i due gruppi in oggetto, la valutazione volumetrica della frazione di eiezione ha evidenziato un valore medio di FE pari a 64,3% nel gruppo 1 e 61,8% nel gruppo 2 con un valore di  $p = 0,017$ . Pur trattandosi di valori che rientrano ampiamente nei

limiti della norma, potrebbe essere ipotizzabile che una più grave carenza vitaminica concorra anche a determinare una lieve riduzione della performance sistolica globale.



## ***6. Conclusioni***

Già da tempo la vitamina D costituisce oramai elemento di attenzione nel percorso diagnostico e terapeutico del paziente con patologia osteoporotica o autoimmunitaria. Numerosi studi, poi, hanno modificato il punto di vista classico che considerava il colecalciferolo come una molecola ad esclusiva azione sul metabolismo calcio-fosforico, rivelandone il pleiotropismo funzionale e facendone considerare il potenziale impatto in ambito cardiovascolare.

In questo filone letterario, promettente ma ancora agli esordi, si inserisce il presente lavoro, che vuole fornire un contributo al miglioramento della comprensione degli specifici effetti della molecola sulla funzione diastolica. La scelta di una popolazione selezionata come quella dei pazienti con LES ci ha permesso da un lato di ottenere a priori un campione sperimentale in cui il deficit vitaminico fosse ubiquitario, e dall'altro, grazie ad una attenta esclusione di quei casi in cui la patologia lupica avesse già manifestato le proprie complicanze cardio-renali, di studiare una popolazione che, seppure ad aumentato rischio cardiovascolare, risultasse ancora nella fase pre-clinica del danno cardiaco.

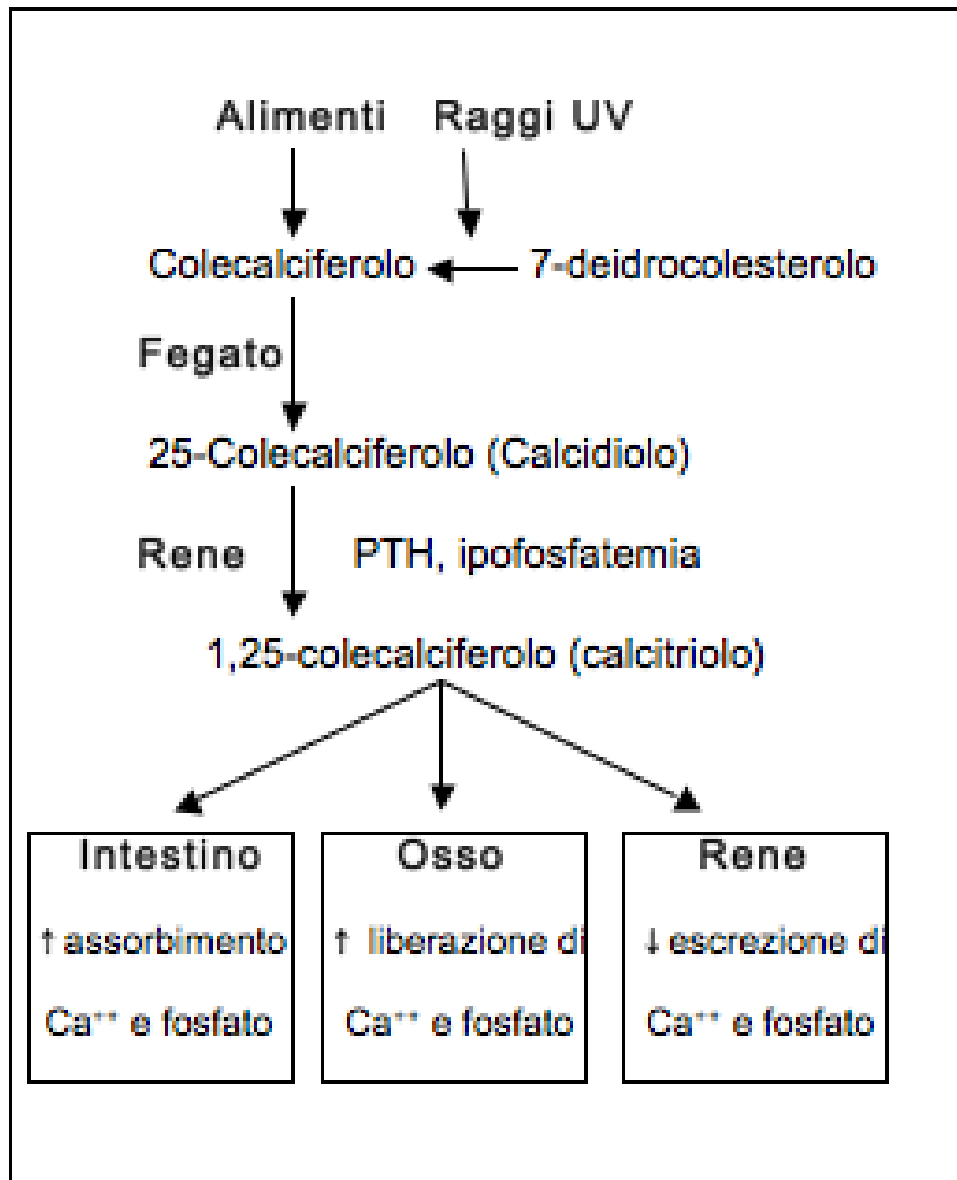
Così facendo, si è potuta evidenziare una significativa, seppure iniziale, influenza della carenza vitaminica D sulla funzione diastolica, che potrebbe rappresentare la traduzione sul piano clinico dei meccanismi biologico-molecolari con cui l'ormone interagisce con i cardiomiociti e con il sistema renina-angiotensina-aldosterone. Ovviamente la attuale numerosità campionaria (determinata essenzialmente dal fatto che risulta oggettivamente complesso poter selezionare soggetti che soddisfino i criteri diagnostici per lupus eritematoso sistemico senza aver ancora esibito i segni del danno d'organo renale o cardiaco secondari alla patologia) non ci permette di trarre conclusioni definitive relativamente al quesito in esame. Da quanto detto si comprende, infatti, come, al momento, il panorama dell'utilizzo terapeutico cardiovascolare della vitamina D appaia costellato di molte potenziali luci, ma anche di non poche ombre : qual' è realmente l'effetto della molecola sulla disfunzione diastolica? Laddove si instaurasse una terapia sostitutiva, l'eventuale cardioprotezione mediata dalla vitamina D sarebbe in

grado di diventare una vera e propria arma di prevenzione dello scompenso cardiaco diastolico?

E' pertanto auspicabile la prosecuzione dell'arruolamento dei pazienti in modo che, aumentata la numerosità campionaria, si possano trarre delle considerazioni di più ampia portata relativamente alla disfunzione diastolica vitamina D-dipendente; laddove questi dati confortassero l'ipotesi iniziale, la naturale prosecuzione scientifica del progetto consisterebbe nel valutare se, dopo adeguata supplementazione terapeutica, sussista una possibilità di regressione dei segni di disfunzione individuati in modo da determinare un "rimodellamento cardiaco inverso" e prevenire, quindi, l'insufficienza cardiaca a frazione di eiezione preservata.

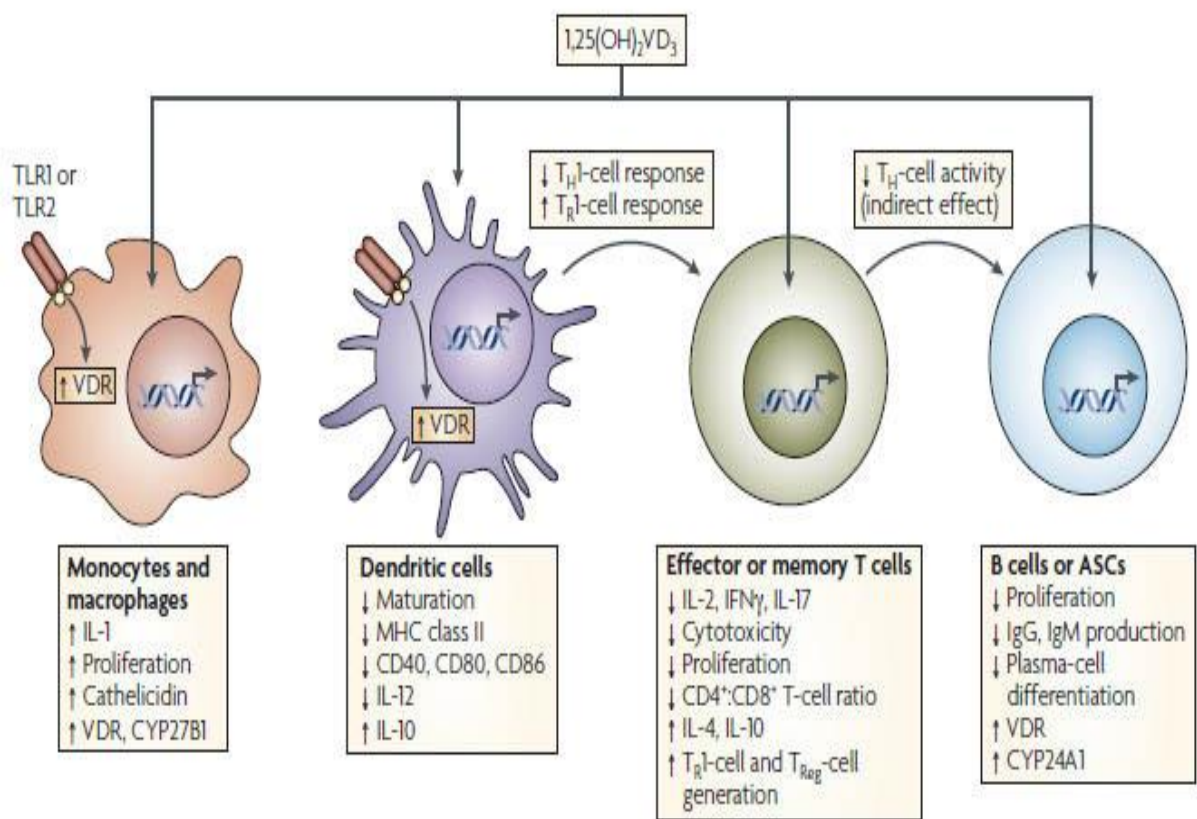
Pertanto, seppure siamo solo all'inizio di una strada lunga e tortuosa, ci auguriamo che il nostro lavoro possa dare, nel lungo termine, un contributo valido alla vittoria su una sfida molto ambiziosa : la prevenzione del danno cardiovascolare in soggetti affetti da patologia autoimmune.

## 7. Indice delle figure



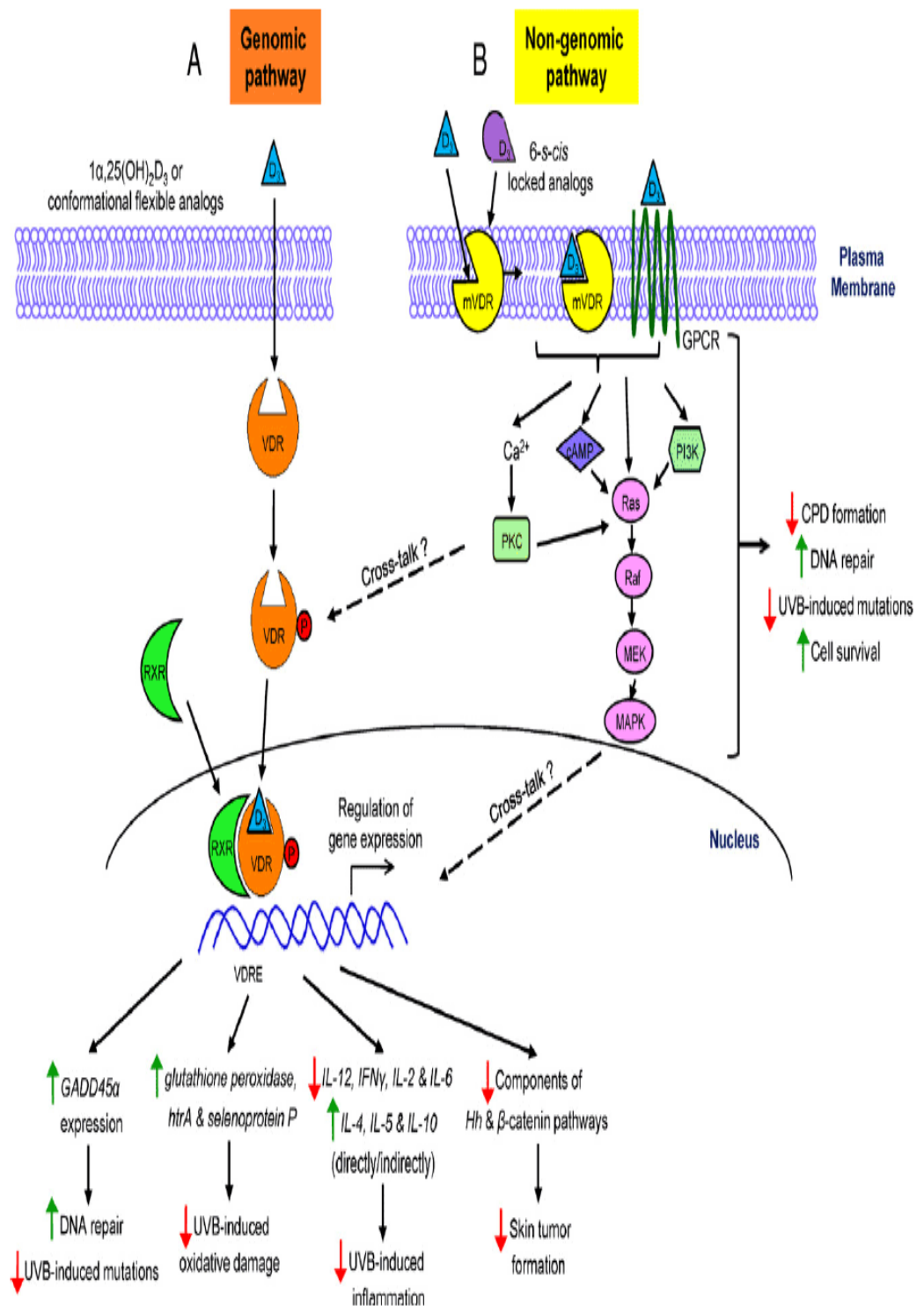
**Fig.1** *Meccanismi di sintesi e di azione biologica della vitamina D*

Fonte : tradotto da : Alpert, PT; Shaikh U. The effects of vitamin D deficiency and insufficiency on the endocrine and paracrine systems. Biol. Res. Nurs., 2007;9:117-129.



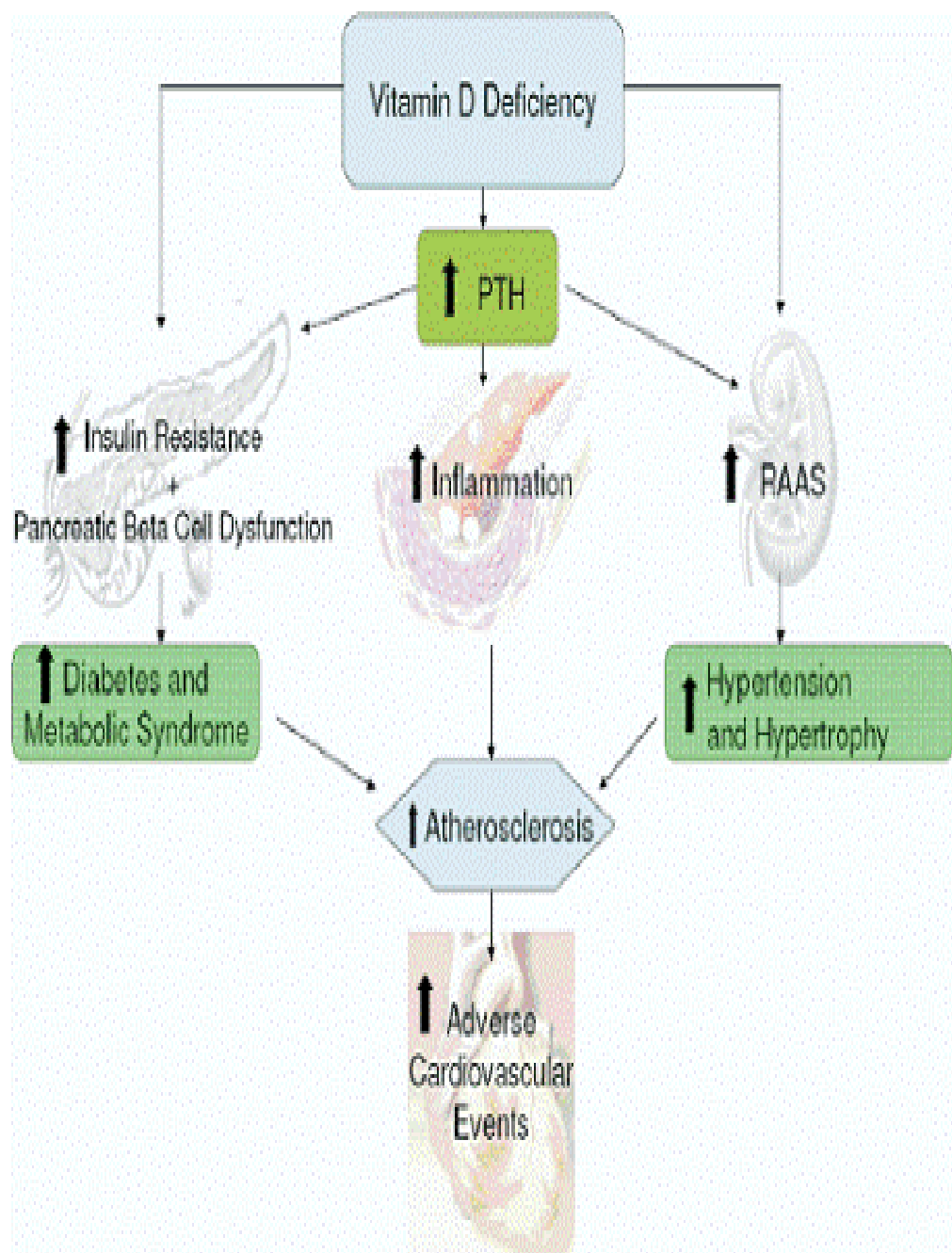
**Fig.2** *Citotipi bioregolati dall'azione della vitamina D e conseguenti effetti molecolari.*

Fonte : Holick MF. Vitamin D : the underappreciated D-lightful hormone that is important for skeletal and cellular death. Curr Opin Endocrinol Diabetes 2002;9:87-98.



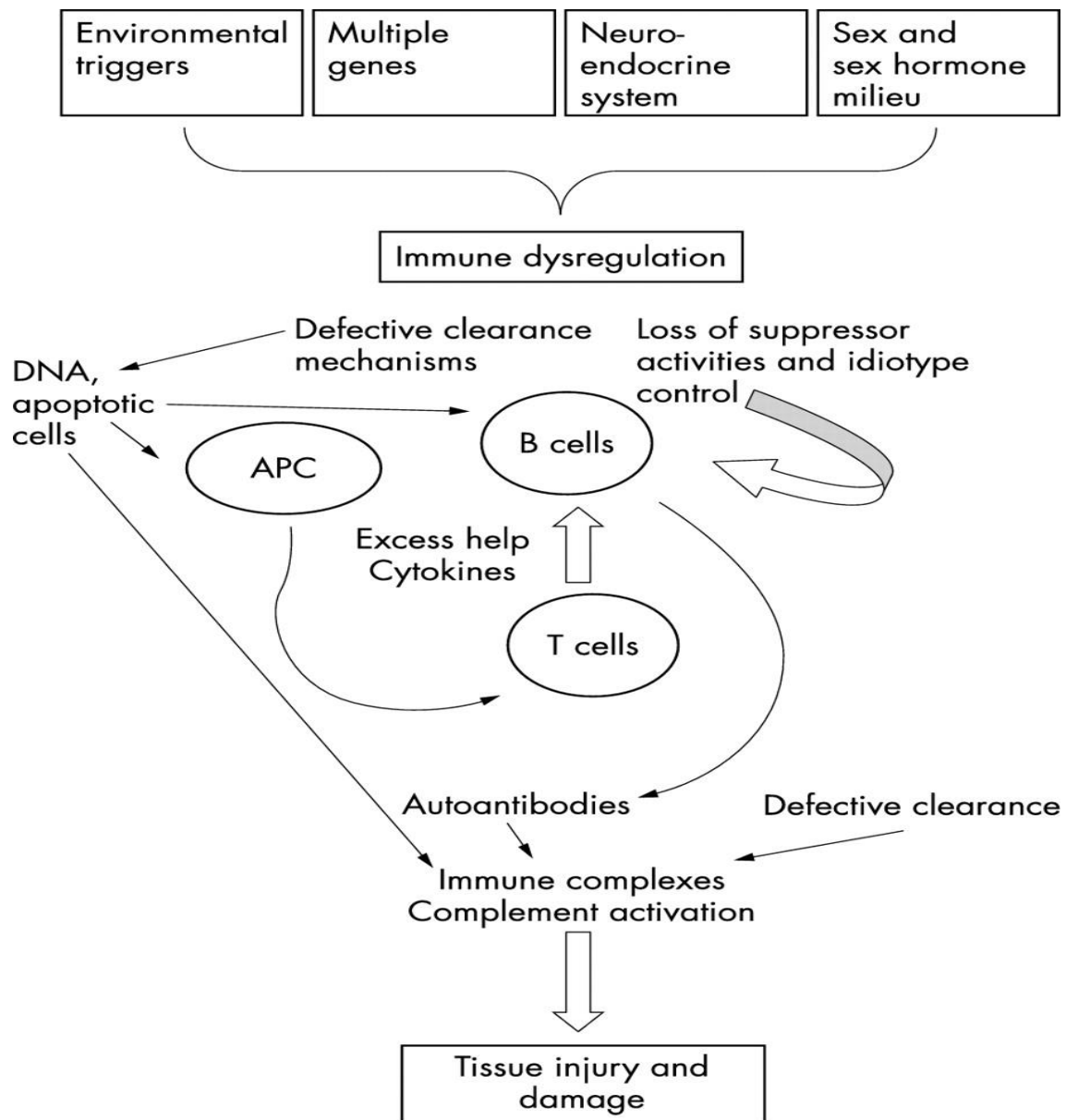
**Fig. 3** *Vitamina D : meccanismo d'azione genomico e non genomico.*

Fonte : Pike, J.W. Vitamin D $_3$  receptors : structure and function in transcription. Annu. Rev. Nutr., 1991, 11:189-216.



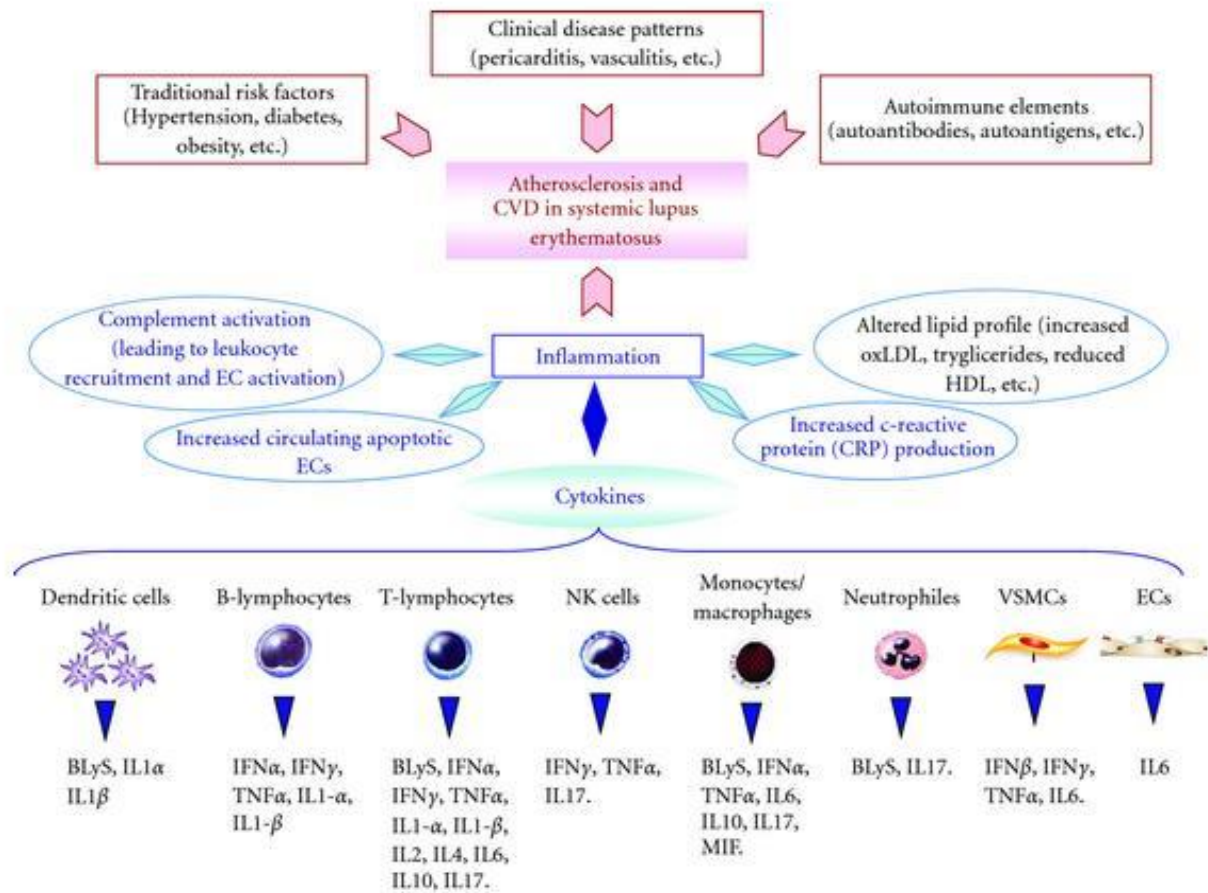
**Fig.4** *Ipovitaminosi D : conseguenze fisiopatologiche cardiovascolari*

Fonte : Martins D, Wolf M, Pan D, et al. Prevalence of cardiovascular risk factors and the serum levels of 25-hydroxyvitamin D in the United States: data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. Arch Intern Med 2007;167:1159-65.



**Fig.5** *Eziopatogenesi multifattoriale del LES.*

Fonte : Bertsias G, Ioannidis JP, Boletis J, et al. EULAR recommendations for the management of systemic lupus erythematosus. Report of a Task Force of the EULAR Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutics. Ann Rheum Dis. 2008;67:195-205



**Fig.6** Sinergia dei meccanismi biologico-molecolari e clinici (tradizionali e non) nella determinazione del danno cardiovascolare lupico.

Fonte : Tincani A, Rebaioli CB, Taglietti M, Shoenfeld Y. Heart involvement in systemic lupus erythematosus, anti-phospholipid syndrome and neonatal lupus. Rheumatology (Oxford) 2006; 45 Suppl 4: iv8-13.

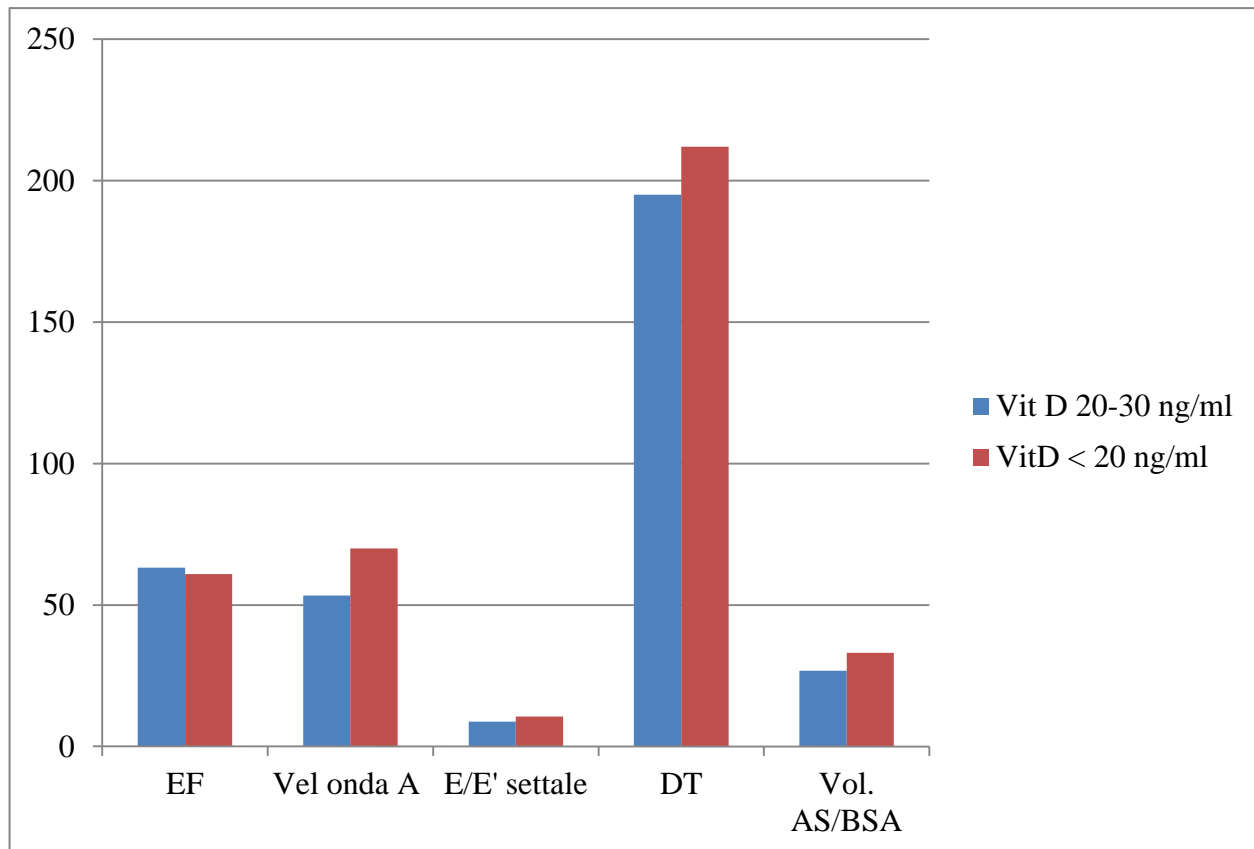


Parametro	Valore
Età	32.5 ± 7
Sesso femminile	50 (100%)
Diabete	0 (0%)
Ipertensione arteriosa sistemica	0 (0%)
Dislipidemia	0 (0%)
Familiarità per CAD	0 (0%)
Pregresso IMA	0 (0%)
Pregressa PCI	0 (0%)
Progresso CABG	0 (0%)
Insufficienza renale cronica	0 (0%)
Terapia con nitroderivati	0 (0%)
Terapia con ACE- inibitori	0 (0%)
Terapia con sartani	0 (0%)
Terapia con ivabradina	0 (0%)
Terapia con calcio-antagonisti	0 (0%)
Terapia con digitale	0 (0%)
Terapia con betabloccanti	0 (0%)
Terapia anticoagulante orale	0 (0%)
Terapia con antiaggreganti	0 (0%)
Terapia con antialdosteronici	0 (0%)
Terapia con antiaritmici	0 (0%)
Terapia con diuretici	0 (0%)
Terapia con statine	0 (0%)
Vitamina D (ng/ml)	15.27 ± 7
Insufficienza di vitamina D (20-30 ng/ml)	23 (46 %)
Carenza di vitamina D (< 20 ng/ml)	27 (54 %)

**Fig.7** *Analisi descrittiva del campione ( caratteristiche di base, valori espressi come media ± ds per le variabili continue o percentuali per le variabili discrete).*

<i>Parametro</i>	<i>Gruppo 1 (23 pz) Vit.D 20-30 ng/ml</i>	<i>Gruppo 2 (27 pz) Vit D &lt; 20 ng/ml</i>	<i>P</i>
<b>EF %</b>	<b>64.3 ± 3.27</b>	<b>61.8 ± 3.8</b>	<b>0.017</b>
GLS %	21.4 ± 2.6	21 ± 2.8	Ns
PP (mm)	8.2 ± 0.7	7.7 ± 1	Ns
SIV (mm)	8.4 ± 0.5	9 ± 1.3	Ns
Velocità onda E cm/s	79 ± 12	84.6 ± 14	Ns
<b>Velocità onda A cm/s</b>	<b>54.4 ± 11</b>	<b>71 ± 13.5</b>	<b>&lt;0.001</b>
E/A	1.3 ± 0.56	1.1 ± 0.22	Ns
E' settale	9.5 ± 3.2	8.1 ± 2	Ns
E' lat	136.65 ± 48	119 ± 38	Ns
<b>E/E' settale</b>	<b>8.1 ± 2.5</b>	<b>13.6 ± 2.4</b>	<b>0.009</b>
E/E' lat	7.97 ± 2.8	8.7 ± 4	Ns
<b>DT (msec)</b>	<b>190 ± 35</b>	<b>218 ± 25</b>	<b>0.047</b>
EDV (ml)	48.9 ± 7.4	44.6 ± 6.8	Ns
ESV (ml)	19.17 ± 6.2	18.7 ± 4.9	Ns
<b>Vol AS/BSA ml/m<sup>2</sup></b>	<b>27.7 ± 6.9</b>	<b>34.3 ± 9.9</b>	<b>0.009</b>

**Fig. 8** Risultati dell'analisi statistica; in verde sono evidenziati i parametri ecocardiografici per i quali è stata raggiunta la significatività statistica.



**Fig. 9** *Grafico dei risultati dell'analisi statistica relativo ai parametri ecocardiografici per i quali è stata raggiunta la significatività statistica.*

## ***8. Bibliografia***

1. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 2007; 357:266-281.
2. Hahn BH, Karpouza GA, Tsao BP. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. In: Harris ED, et al, eds. *Kelley's Textbook of Rheumatology*. 7<sup>th</sup> ed. Philadelphia, Pa: WB Saunders; 2005:1174-1200.
3. Zittermann A, Schleithoff SS, Koerfer R. Putting cardiovascular disease and vitamin D insufficiency into perspective. *Br J Nutr* 2005; 94:483-92.
4. Kimball S, Fuleihan Gel-H, Vieth R. Vitamin D : a growing perspective. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2008; 45:339-414.
5. Rostand SG, Drueke TB. Parathyroid hormone, vitamin D and cardiovascular disease in chronic renal failure. *Kidney Int* 1996; 56:383-92.
6. Holick MF. Vitamin D : photobiology, metabolism, mechanism of action, and clinical applications. In : Favus MJ, ed. *Primer on the metabolic bone disease and disorder of mineral metabolism*. 4<sup>th</sup> edition. Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins, 1999:92-8.
7. Pike, J.W. Vitamin D3 receptors : structure and function in transcription. *Annu. Rev. Nutr.*, 1991, 11:189-216.
8. Dusso, AS; Brown AJ.; Siatolpolsky E. Vitamin D. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 2005, 289, F8-F28.
9. Adorini L. Tolerogenic dendritic cells induced by vitamin D receptor ligands enhance regulatory T cells inhibiting autoimmune diabetes. *Ann. NY Acad Sci.*, 2003, 987;258-261.
10. Alpert, PT; Shaikh U. The effects of vitamin D deficiency and insufficiency on the endocrine and paracrine systems. *Biol. Res. Nurs.*, 2007;9:117-129.
11. Holick MF. High prevalence of vitamin D inadequacy and implications for health. *Mayo Clin Proc* 2006; 81:353-373.
12. Institute of Medicine. *Dietary reference intakes for calcium and vitamin D*. Washington; National Academy Press; 2011.
13. Poduje S, Sjerobabski-Masneć I, Ozani-Buli S. Vitamin D – The true and the false about vitamin D. *Coll Antropol* 2008; 32 Suppl 2:159-62.
14. Hatchcock JN, Shao A, Vieth R, Heaney R. Risk assessment for vitamin D. *Am J Clin Nutr* 2007;85:6-18.

15. Cardus, A; Panizo S; Parisi E; Fernandez E; Valdivielso JM. Differential effects of vitamin D analogues on vascular calcification. *J. Bone. Miner. Res.*, 2007;22:860-866.85.
16. Tishkoff DX; Nibbelink KA; Holmberg KH; Dandu L; Simpson RU. Functional vitamin D receptor (VDR) in the tubules of cardiac myocytes; VDR knockout cardiomyocyte contractility. *Endocrinology*, 2008;149:558-564.
17. Pilz S, Marz W, Wellnitz B, et al. Association of vitamin D deficiency with hearth failure and sudden cardiac death in a large cross-sectional study of patient referred for coronary angiography. *J Clin Endocrinol Metabol* 2008; 93:3927-35.
18. Zittermann A, Fischer J, Schleitoff SS, Tenderich G, Fuchs U, Koerfer R. Patients with congestive heart failure and healthy controls differ in vitamin D-associated lifestyle factors. *Int J Vitamin Nutr Res* 2007;77:280-8.
19. Schleitoff SS, Zittermann A, Tenderich G, Berthold HK, Stehle P, Koerfer R. Vitamin D supplementation improves cytokine profile in patients with congestive heart failure: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Am J Clin Nutr* 2006; 83:754-9.
20. Kimball S, Fuleihan Gel-H, Vieth R. Vitamin D: a growing perspective. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2008; 45:339-414.
21. O'Connel TD, Berry JE, Jarvis AK, Somerman MJ, Simpson RU. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 regulation of cardiac myocyte proliferation and hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1997;272:H1751-H1758.
22. Nibbelink KA, Tishkoff DX, Hershey SD, Rahman A, Simpson RU. 1,25(OH)<sub>2</sub>-vitamin D<sub>3</sub> actions on cell proliferation, size, gene expression, and receptor localization, in the HL-1 cardiac myocyte. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007; 103:533-7.
23. Wood JC, Claster S, Carson S, et al. Vitamin D deficiency, cardiac iron and cardiac function in thalassaemia major. *Br J Haematol* 2008; 141:891-4.
24. Green JJ, Robinson DA, Wilson GE, Simpson RU, Westfall MV. Calcitriol modulation of cardiac contractile performance via protein kinase C. *J Mol Cell Cardiol* 2006;41:350-9.

25. Hintzpeter B, Mensink GB, Thierfelder W, Muller MJ, Scheidt-Nave C. Vitamin D status and health correlates among German adults. *Eur J Clin Nutr* 2008;62:1079-89.
26. Martins D, Wolf M, Pan D, et al. Prevalence of cardiovascular risk factors and the serum levels of 25-hydroxyvitamin D in the United States: data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Arch Intern Med* 2007;167:1159-65.
27. Hypponen E, Power C. Vitamin D status and glucose homeostasis in the 1958 British Birth Cohort: the role of obesity. *Diabetes Care* 2006; 29:2244-6.
28. Pittas AG, Lau J, Hu FB, Dawson-Hughes B. The role of vitamin D and calcium in type 2 diabetes. A systematic review and meta-analysis. *Clin Endocrinol Metab* 2007; 92:2017-29.
29. Xiang W, Kong J, Chen S et al. Cardiac hypertrophy in vitamin D receptor knock out mice: role of the systemic and cardiac renin-angiotensin systems. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 288:E125-32.
30. Li YC, Kong J, Wei M, Chen ZF, Liu SQ, Cao LP. 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> is a negative endocrine regulator of the rennin-angiotensin systems. *J. Clin. Invest.*, 2002;110:229-238.
31. Pfeifer M, Begerow B, Minne HW, Natchtigall D, Hansen C. Effects of a short term vitamin D<sub>3</sub> and calcium supplementation on blood pressure and parathyroid hormone levels in elderly women. *Clin Endocrinol Metabol* 2001;86:1633-7.
32. Sugden JA, Davies JJ, Witham MD, Morris AD, Struthers AD. Vitamin D improves endothelial function in patients with type 2 diabetes mellitus and low vitamin D levels. *Diabet Med* 2008; 25:320-5.
33. Liu S, Song Y, Ford ES, Manson JE, Buring JE, Ridker PM. Dietary calcium, vitamin D and the prevalence of metabolic syndrome in middle-aged and older U.S. women. *Diabetes Care* 2005;28:2926-32.
34. Zittermann A. Vitamin D and disease prevention with special reference to cardiovascular disease. *Progr Biophys Mol Biol* 2006;92:39-48.
35. Moon BD, Bandy B, Davison AJ. Hypothesis : etiology of atherosclerosis and osteoporosis : are imbalances in the calciferol endocrine system implicated? *J Am Coll Nutr* 1992; 11:567-83.

36. Margolis JR, Chen JT, Kong Y, Peter RH, Behar VS, Kisslo JA. The diagnostic and prognostic significance of coronary artery calcification : a report of 800 cases. *Radiology* 1980; 137:609-16.
37. De Boer IH, Kestenbaum B, Shoben AB, Michos ED, Sarnak MJ, Siscovick DS. 25-Hydroxyvitamin D levels inversely associate with risk for developing coronary artery calcification. *J Am Soc Nephrol* 2009;20:1805-12.
38. Watson KE, Abrolat ML, Malone LL, et al. Active serum vitamin D levels are inversely correlated with coronary calcification. *Circulation* 1997;96:1755-60.
39. Wilhelmsen L, Rosengren A, Eriksson H, Lappas G. Heart failure in the general population of men – morbidity, risk factor and prognosis. *J Intern Med* 2001;249:253-61.
40. Wang TJ, Pencina MJ, Booth SL et al. Vitamin D deficiency and risk of cardiovascular disease. *Circulation* 2008;117:503-11.
41. Hsia J, Heiss G, Ren H et al. Women’s Health Initiative Investigators. Calcium/vitamin D supplementation and cardiovascular events. *Circulation* 2007; 115:846-54.
42. Giovannucci E, Liu Y, Hollis BW, Rimm EB. 25-hydroxyvitamin D and risk of myocardial infarction in men: a prospective study. *Arch Intern Med* 2008; 168: 1174-80.
43. Dobnig H, Pilz S, Scharnagl H et al. Independent association of low serum 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D levels with all-cause and cardiovascular mortality. *Arch Intern Med* 2008; 168: 1340-9.
44. Trivedi DP, Doll R, Khaw KT. Effect of four monthly oral vitamin D3 (cholecalciferol) supplementation on fractures and mortality in men and women living in the community: randomised double blind controlled trial. *BMJ* 2003; 326: 469-72.
45. Autier P, Gandini S. Vitamin D supplementation and total mortality: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Arch Intern Med* 2007; 167: 1730-7.
46. Boxer RS, Dauser DA, Walsh SJ, Hager WD, Kenny AM. The association between vitamin D and inflammation with the 6-minute walk and frailty in patients with heart failure. *J Am Geriatr Soc* 2008; 56: 454-61.

47. Zittermann A, Schleithoff SS, Götting C, et al. Poor outcome in end-stage heart failure patients with low circulating calcitriol levels. *Eur J Heart Fail* 2008; 10: 321-7
48. Blotzer JW. Systemic lupus erythematosus, I: historical aspects. *Md State Med J* 1983;32:439-441.
49. Hebra F, Adams F. On Diseases of the Skin including the Exanthemata. London, The New Sydenham Society London 1866; Vol 1.
50. Kaposi M. Lupus vulgaris. In: Hebra, F Kaposi M (eds). On Diseases of the Skin including the Exanthemata, Vol IV. Tay W. London, The New Sydenham Society, 1875.
51. Osler W. On the visceral complications of erythema exudativum multiforme. *Am J Med Sci* 1895;110:629-646.
52. Jadassohn J. Lupus erythematoses. In: Mracek F, editor. *Handbuch der Hautkrankheiten*. Wein, Alfred Holder, 1904, pp 298-404l.
53. Libman E, Sacks B. A hitherto undescribed form of valvular and mural endocarditis. *Arch Intern Med* 1924;33:701.
54. Klemperer P, Pollack A, Baehr G. Diffuse collagen disease: acute disseminated lupus erythematosus and diffuse scleroderma. *JAMA* 1984;251:1593-1594.
55. Hargraves MM. Discovery of the LE cell and its morphology. *Mayo Clin Proc* 1969;44:579-599.
56. Danchenko N, Satia JA, Anthony MS. Epidemiology of systemic lupus erythematosus: a comparison of worldwide disease burden. *Lupus*. 2006;15(5):308-18.
57. Symmons DP. Frequency of lupus in people of African origin. *Lupus*. Jun 1995;4(3):176-8.
58. Manzi S. Epidemiology of systemic lupus erythematosus. *Am J Manag Care*. Oct 2001;7(16 Suppl):S474-9.
59. Moder KG, Miller TD, Tazelaar HD. Cardiac involvement in systemic lupus erythematosus. *Mayo Clin Proc* 1999; 74:275.
60. Sestak AL, Fürnrohr BG, Harley JB, Merrill JT, Namjou B. The genetics of systemic lupus erythematosus and implications for targeted therapy. *Ann Rheum Dis*. Mar 2011;70 Suppl 1:37-43.
61. Sanchez E, Nadig A, Richardson BC, et al. Phenotypic associations of genetic



- susceptibility loci in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* Oct 2011;70(10):1752-7.
62. Moser KL, Kelly JA, Lessard CJ, Harley JB. Recent insights into the genetic basis of systemic lupus erythematosus. *Genes Immun.* Jul 2009;10(5):373-9.
  63. Lehmann P, Hölzle E, Kind P, Goerz G, Plewig G. Experimental reproduction of skin lesions in lupus erythematosus by UVA and UVB radiation. *J Am Acad Dermatol.* Feb 1990;22(2 Pt 1):181-7.
  64. Reidenberg MM, Drayer DE, Lorenzo B, et al. Acetylation phenotypes and environmental chemical exposure of people with idiopathic systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1993;36:971-973.
  65. Tsokos GC, Magrath IT, Balow JE. Epstein-Barr virus induces normal B cell responses but defective suppressor T cell responses in patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* Oct 1983;131(4):1797-801.
  66. Costenbader KH, Feskanich D, Stampfer MJ, Karlson EW. Reproductive and menopausal factors and risk of systemic lupus erythematosus in women. *Arthritis Rheum.* Apr 2007;56(4):1251-62.
  67. Arbuckle MR, McClain MT, Rubertone MV, et al. Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med.* Oct 16 2003;349(16):1526-33.
  68. Andrade F, Casciola-Rosen L, Rosen A. Apoptosis in systemic lupus erythematosus. Clinical implications. *Rheum Dis Clin North Am.* May 2000;26(2):215-27.
  69. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* Sep 1997;40(9):1725.
  70. Petri M, Orbai AM, Alarcón GS, et al. Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* Aug 2012;64(8):2677-86.
  71. Kitas G, Banks MJ, Bacon PB. Cardiac involvement in rheumatoid disease. *Clin Med* 2001;1:18.
  72. Luigi MP, Schur PH. ANA screening: an old test with new recommendations. *Ann Rheum Dis.* 2010.
  73. D'Agati VD, Appel GB. Lupus Nephritis: Pathology and Pathogenesis. In:

- Wallace DJ, Hahn BH, eds. Dubois' Lupus Erythematosus. 7<sup>th</sup> ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2007:1094-111.
74. Cervera R et al. Systemic lupus erythematosus: clinical and immunologic patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. The European Working Party on Systemic Lupus Erythematosus. *Medicine (Baltimore)*, 1993 Mar;72(2):113-24
  75. Firestein GS, Budd RC, Harris ED Jr, et al, eds. Kelley's Textbook of Rheumatology. 8<sup>th</sup> ed. Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier; 2008.
  76. Callen JP. Systemic lupus erythematosus in patients with chronic cutaneous (discoid) lupus erythematosus. Clinical and laboratory findings in seventeen patients. *J Am Acad Dermatol*. Feb 1985;12(2 Pt 1):278-88.
  77. Iagnocco A, Ossandon A, Coari G, Conti F , Priori R , Alessandri C, Valesini G. Wrist joint involvement in sistemi lupus erythematosus. An ultrasonographic study. *Clin Exp Rheum* 2004;22:621-624.
  78. Oinuma K, Harada Y, Nawata Y, Takabayashi K, Abe I, Kamikawa K, et al. Osteonecrosis in patients with systemic lupus erythematosus develops very early after starting high dose corticosteroid treatment. *Ann Rheum Dis*. Dec 2001;60(12):1145-8.
  79. Gladman DD, Urowitz MB, Chaudhry-Ahluwalia V, Hallet DC, Cook RJ. Predictive factors for symptomatic osteonecrosis in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*. Apr 2001;28(4):761-5.
  80. Swigris JJ, Fischer A, Gillis J, Meehan RT, Brown KK. Pulmonary and thrombotic manifestations of systemic lupus erythematosus. *Chest* 2008;133(1):271–280.
  81. Quadrelli SA, Alvarez C, Arce SC, et al. Pulmonary involvement of systemic lupus erythematosus: analysis of 90 necropsies. *Lupus* 2009;18(12):1053–1060.
  82. Mittoo S, Fischer A, Strand V, Meehan R, Swigris JJ. Systemic lupus erythematosus-related interstitial lung disease. *Curr Rheumatol Rev* 2010;6(2):99–107.
  83. Fishbein GA, Fishbein MC. Lung vasculitis and alveolar hemorrhage: pathology. *Semin Respir Crit Care Med* 2011;32(3):254–263.
  84. Dhala A. Pulmonary arterial hypertension in systemic lupus erythematosus: current status and future direction. *Clin Dev Immunol* 2012; 854-941.

85. Makol A, Petri M. Pancreatitis in systemic lupus erythematosus: frequency and associated factors. A review of the Hopkins lupus cohort. *J Rheumatol*. 2010;37:341–345.
86. Sultan SM, Ioannou Y, Isenberg DA. A review of gastrointestinal manifestations of systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)*. 1999;38:917–932.
87. Ebert EC, Hagspiel KD. Gastrointestinal and hepatic manifestations of systemic lupus erythematosus. *J Clin Gastroenterol*, 2011;45(5):436-41.
88. Bashal F. Hematological disorders in patients with systemic lupus erythematosus. *Open Rheumatol J*, 2013;7:87-95.
89. The American College of Rheumatology nomenclature and case definitions for neuropsychiatric lupus syndromes. *Arthritis Rheum*. Apr 1999;42(4):599-608.
90. Davidson A, Diamond B. Autoimmune diseases. *N Engl J Med* 2001;340-54
91. Borowoy AM, Pope JE, Silverman E, Fortin PR, Pineau C, Smith CD. Neuropsychiatric lupus: the prevalence and autoantibody associations depend on the definition: results from the 1000 faces of lupus cohort. *Semin Arthritis Rheum*. Oct 2012;42(2):179-85.
92. Dooley MA. Clinical and laboratory features of lupus nephritis. In: Wallace DJ, Hahn BH, eds. *Dubois' Lupus Erythematosus*. 7<sup>th</sup> ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2007:1112-30.
93. Ortega LM, Schultz DR, Lenz O, et al. Review: Lupus nephritis: pathologic features, epidemiology and a guide to therapeutic decisions. *Lupus* 2010; 19:557.
94. Urowitz MB, Gladman DD. Measures of disease activity and damage in SLE. *Baillieres Clin Rheumatol*. 1998;12:405-413.
95. Gladman D, Ginzler E, Goldsmith C, et al. The development and initial validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology damage index for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1996;39:363-369.
96. Urowitz MB, Bookman AA, Koehler BE, Gordon DA, Smythe HA, Ogryzlo MA. The bimodal mortality pattern of systemic lupus erythematosus. *Am J Med*. Feb 1976;60(2):221-5.

97. Navarra SV, Leynes MS. Infections in systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2010;19:1419-1424.
98. Faurschou M, Mellemkjaer L, Starklint H, et al. High risk of ischemic heart disease in patients with lupus nephritis. *J Rheumatol*. Nov 2011;38(11):2400-5.
99. Kipen Y et al. (1997) Prevalence of reduced bone mineral density in systemic lupus erythematosus and the role of steroids. *J Rheumatol* 24: 1922–1929.
100. Bernatsky S, Ramsey-Goldman R, Rajan R, et al. Non-Hodgkin's lymphoma in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2005; 64:1507–1509.
101. Hahn BH. Management of Systemic Lupus Erythematosus. In: Harris ED, et al, eds. *Kelley's Textbook of Rheumatology*. 7<sup>th</sup> ed. Philadelphia, Pa: WB Saunders; 2005:1225-47.
102. Bertsias G, Ioannidis JP, Boletis J, et al. EULAR recommendations for the management of systemic lupus erythematosus. Report of a Task Force of the EULAR Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutics. *Ann Rheum Dis*. 2008;67:195-205.
103. Alarcón GS, McGwin G, Bertoli AM, Fessler BJ, Calvo-Alén J, Bastian HM, et al. Effect of hydroxychloroquine on the survival of patients with systemic lupus erythematosus: data from LUMINA, a multiethnic US cohort (LUMINA L). *Ann Rheum Dis*. Sep 2007;66(9):1168-72.
104. Hahn BH, McMahon MA, Wilkinson A, et al. American College of Rheumatology guidelines for screening, treatment, and management of lupus nephritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. Jun 2012;64(6):797-808.
105. Bertsias GK, Ioannidis JP, Aringer M, et al. EULAR recommendations for the management of systemic lupus erythematosus with neuropsychiatric manifestations: report of a task force of the EULAR standing committee for clinical affairs. *Ann Rheum Dis*. Dec 2010;69(12):2074-82.
106. Murdaca G, Colombo BM, Puppo F. Emerging biological drugs: a new therapeutic approach for Systemic Lupus Erythematosus. An update upon efficacy and adverse events. *Autoimmun Rev*. Nov 2011;11(1):56-60.

107. Petri M,(2004). Cardiovascular Systemic Lupus Erythematosus, Systemic Lupus Erythematosus. Robert G. Lahita, (Ed) 913-941, Elsevier, ISBN 0-12-433901-8, USA.
108. Tincani A, Rebaioli CB, Taglietti M, Shoenfeld Y. Heart involvement in systemic lupus erythematosus, anti-phospholipid syndrome and neonatal lupus. *Rheumatology (Oxford)* 2006; 45 Suppl 4: iv8-13.
109. Bonow RO, Mann DL, Zipes DP et al. Braunwald's heart disease: A textbook of cardiovascular medicine. Saunders, Philadelphia 2011:2107-2116.
110. Vogel T, Kitcharoensakkul M, Fotis L, Baszis K. The heart and pediatric rheumatology. *Rheum Dis Clin North Am.* Feb 2014;40(1):61-85.
111. Yang CH, Chen JY, Lee SC, Luo SF. Successful preventive treatment of congenital heart block during pregnancy in a woman with systemic lupus erythematosus and anti-Sjögren's syndrome A/Ro antibody. *J Microbiol Immunol Infect.* Oct 2005;38(5):365-9.
112. Crozier IG, Li E, Milne MJ, Nicholls MG. Cardiac involvement in systemic lupus erythematosus detected by echocardiography. *Am J Cardiol.* 1990; 65:1145–8.
113. Topaloglu, S., Aras, D., Ergun, K., Altay, H., Alyan, O., & Akgul, A. (2006). Systemic lupus erythematosus: an unusual cause of cardiac tamponade in a young man. *Eur J Echocardiogr*, 7(6), 460-462.
114. Bidani, A. K., Roberts, J. L., Schwartz, M. M., & Lewis, E. J. (1980). Immunopathology of cardiac lesions in fatal systemic lupus erythematosus. *Am J Med*, 69(6), 849-858.
115. Rosenbaum, E., Krebs, E., Cohen, M., Tiliakos, A., & Derk, C. T. (2009). The spectrum of clinical manifestations, outcome and treatment of pericardial tamponade in patients with systemic lupus erythematosus: a retrospective study and literature review. *Lupus*, 18(7), 608-612.
116. Bruce, I. N., Urowitz, M. B., Gladman, D. D., Ibanez, D., & Steiner, G. (2003). Risk factors for coronary heart disease in women with systemic lupus erythematosus: the Toronto Risk Factor Study. *Arthritis Rheum*, 48(11), 3159-3167.
117. Manzi, S., Selzer, F., Sutton-Tyrrell, K., Fitzgerald, S. G., Rairie, J. E., Tracy, R. P., & Kuller, L. H. (1999). Prevalence and risk factors of carotid

- plaque in women with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 42(1), 51-60.
118. Shoenfield Y, Gerli R, Doria A, Matsuura E, Cerinic MM, Ronda N, et al. Accelerated atherosclerosis in autoimmune rheumatic diseases. *Circulation*. 2005;112:3337-47.
  119. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002;420:868-74.
  120. Roifman I, Beck PL, Anderson TJ, Eisenberg MJ, Genest J. Chronic inflammatory diseases and cardiovascular risk: a systematic review. *Can J Cardiol*. 2011;27:174-82.
  121. Bruce IN, Urowitz MB, Gladman DD, Ibañez D, Steiner G. Risk factors for coronary heart disease in women with systemic lupus erythematosus: the Toronto Risk Factor Study. *Arthritis Rheum*. 2003;48:3159–67.
  122. Batuca, J. R., Ames, P. R., Isenberg, D. A., Alves, J. D. (2007). Antibodies toward high-density lipoprotein components inhibit paraoxonase activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann N Y Acad Sci*, 1108, 137-146.
  123. UrowitzMB, Gladman D, Ibañez D, Bae SC, Sanchez-Guerrero J, Gordon C, et al. Atherosclerotic vascular events in a multinational inception cohort of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Care Res*. 2010;62:881–7.
  124. Ryan, M. J. (2009). The pathophysiology of hypertension in systemic lupus erythematosus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 296(4), R1258-1267.
  125. Chung CP, Oeser A, Solus JF, Gebretsadik T, Shintani A, Avalos I, et al. Inflammation-associated insulin resistance: differential effects in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus define potential mechanisms. *Arthritis Rheum*. 2008;58:2105–12.
  126. Haque S, Gordon C, Isenberg D, Rahman A, Lanyon P, BELL A, et al. Risk factors for clinical coronary heart disease in systemic lupus erythematosus: the Lupus and Atherosclerosis Evaluation of Risk (LASER) study. *J Rheumatol*. 2010;37:322-9.
  127. Erkkila, A. T., Narvanen, O., Letho, S., Uusitupa, M. I., e Yla-Herttuala, S. (2005). Antibodies against oxidized LDL and cardiolipin and mortality in patients with coronary heart disease. *Atherosclerosis*, 183(1), 157-162.

128. Giles, I., e Rahman, A. (2009). How to manage patients with sistemic lupus erythematosus who are also antiphospholipid antibody positive. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 23(4), 525-537.
129. Skamra, C., e Ramsey-Goldman, R. (2010). Management of cardiovascular complications in systemic lupus erythematosus. *Int J Clin Rheumatol*, 5(1), 75-100.
130. Petri MA, Kiani AN, Post W, Christopher-Stine L, e Magder LS (2011). Lupus Atherosclerosis Prevention Study (LAPS). *Ann Rheum Dis*, 70(5), 760-765.
131. Trelle S, Reichenbach S, Wandel S, Hildebrand P, Tschannen B, Villiger PM, et al. Cardiovascular safety of non-steroidal b anti-inflammatory drugs: network meta-analysis. *BMJ*. 2011;342:c7086.
132. Petri M, Lakatta C, Magder L, e Goldman D (1994). Effect of prednisone and hydroxychloroquine on coronary artery disease risk factors in systemic lupus erythematosus. A longitudinal data analysis. *Am J Med*, 96(3), 254-259.
133. Westlake SL, Colebatch AN, Baird J, Kiely P, Quinn M, Choy E, et al. The effect of methotrexate on cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis: a systematic literature review. *Rheumatology*. 2010;49:295-307.
134. Alarcon GS, McGwin G, Bertoli AM, Fessler BJ, Calvo-Alen J, Bastian HM, et al. Effect of hydroxychloroquine on the survival of patients with systemic lupus erythematosus: data from LUMINA, a multiethnic US cohort (LUMINA I). *Ann Rheum Dis*. 2007;66:1168-72.
135. Elliott, JR e Manzi S (2009). Cardiovascular risk assessment and treatment in systemic lupus erythematosus. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 23(4), 481-494.
136. J. Bourr'e-Tessier, T Huynh, AE Clarke et al. Features associated with cardiac abnormalities in systemic lupus erythematosus. *Lupus*, vol. 20, no. 14, pp. 1518-1525, 2011.
137. Libman E, Sacks B. A hitherto undescribed form of valvular and mural endocarditis. *Arch Intern Med*. 1924;33:701-37.

138. E Ferreira, PM Bettencourt, LM Moura. Valvular lesions in patients with systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome: An old disease but a persistent challenge. *Revista Portuguesa de Cardiologia*, vol. 31, no. 4, pp. 295–299, 2012.
139. I Moyssakis, MG Tektonidou, VA Vasilliou, M Samarkos, V Votteas, HM Moutsopoulos. Libman-Sacks endocarditis in systemic lupus erythematosus: prevalence, associations, and evolution. *American Journal of Medicine*, vol. 120, no. 7, pp. 636–642, 2007.
140. LW Lan, C Tsai, CJ Hou. The valvular involvement of lupus: congestive heart failure can be the presenting feature of systemic lupus erythematosus. *Acta Cardiologica Sinica*, vol. 21, no. 2, pp. 111–115, 2005.
141. R Hoffman, H Lethen, U Zunker, FA Schondube, N Maurin, HG Sieberth. Rapid appearance of severe mitral regurgitation under high-dosage corticosteroid therapy in a patient with systemic lupus erythematosus. *European Heart Journal*, vol. 15, no. 1, pp. 138–139, 1994.
142. CM Vassileva, MN Swong, TM Boley, SJ Markwell, SR Hazelrigg. Influence of systemic lupus erythematosus on procedure selection and outcomes of patients undergoing isolated mitral valve surgery,” *Journal of Cardiac Surgery*, vol. 27, no. 1, pp. 29–33, 2012.
143. S Taguchi, K Hashimoto, Y Sakamoto, H Okuyama, S Ishii. “A case of mitral valve plasty for Libman-Sacks endocarditis mimicking a cardiac tumor”. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, vol. 132, no. 6, pp. 1465–1467, 2006.
144. Worstman J et al. Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *Am J Clin Nutr* 2000 72(3):690-3.
145. Sherif FN, Appleton CP, Thierry CG, Marino PN, Oh JK, Smiseth OA, Waggoner AD, Flachskampf FA, Pellikka PA, Evangelisa A. EAE/ASE Recommendations for the evaluation of left ventricular diastolic function by echocardiography. *European Journal of Echocardiography* 2009; 10:165-193.
146. Tsang TS, Barnes ME, Gersh BJ, Bailey KR, Seward JB. Left atrial volume as a morphophysiologic expression of left ventricular diastolic



- dysfunction and relation to cardiovascular risk burden. *Am J Cardiol* 2002;90: 1284–9. 12.
147. Rapp AH, Lange RA, Cigarroa JE, Keeley EC, Hillis LD. Relation of pulmonary arterial diastolic and mean pulmonary arterial wedge pressures in patients with and without pulmonary hypertension. *Am J Cardiol* 2001;88:823–4.
  148. Appleton CP, Jensen JL, Hatle LK, Oh JK. Doppler evaluation of left and right ventricular diastolic function: a technical guide for obtaining optimal flow velocity recordings. *J Am Soc Echocardiogr* 1997;10: 271–91. 23.
  149. Kasner M, Westermann D, Steendijk P, Gaub R, Wilkenshoff U, Weitmann K et al. Utility of Doppler echocardiography and tissue Doppler imaging in the estimation of diastolic function in heart failure with normal ejection fraction: a comparative Doppler-conductance catheterization study. *Circulation* 2007;11:637–47. 107.
  150. Amundsen BH, Helle-Valle T, Edvardsen T, Torp H, Crosby J, Lyseggen E et al. Noninvasive myocardial strain measurement by speckle tracking echocardiography: validation against sonomicrometry and tagged magnetic resonance imaging. *J Am Coll Cardiol* 2006;47:789–93.
  151. Adami S, Romagnoli E, Carnevale V, Scillitani A, Giusti A, Rossini M, Gatti D, Nuti R, Minisola S. Linee guida su prevenzione e trattamento dell'ipovitaminosi D con colecalciferolo *Reumatismo*, 2011; 63 (3): 129-147